Aus der Abteilung für gynäkologische Endokrinologie
(Leiter: Prof. Dr. J. Hammerstein) der WE Frauenklinik im
Klinikum Steglitz der Freien Universität
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Hörmann

Die Bestimmung von Progesteron im Plasma mit einer Proteinbindungsmethode und ihre klinische Bedeutung anhand von ausgewählten Beispielen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Rüdiger Dreykluft

geb. in Göttingen

1973

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41552710_0111

Aus der Abteilung für gynäkologische Endokrinologie
(Leiter: Prof. Dr. J. Hammerstein) der WE Frauenklinik im
Klinikum Steglitz der Freien Universität
Geschäftsführender Direktor: Prof. Dr. G. Hörmann

Die Bestimmung von Progesteron im Plasma mit einer Proteinbindungsmethode und ihre klinische Bedeutung anhand von ausgewählten Beispielen

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der medizinischen Doktorwürde
an den Medizinischen Fachbereichen
der Freien Universität Berlin

vorgelegt von

Hans-Rüdiger Dreykluft

geb. in Göttingen

Referent: Prof. Dr. J. Hammerstein

Korreferent: Prof. Dr. Dr. E. Gerhards

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fachbereiche der Freien Universität Berlin

UNIV. LEIDEN BIBL.

Promoviert am: 14.9.1973

Inhalt

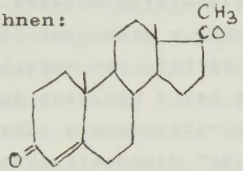
1.	Einleitung	S. 1
1.1.	Das Corpus luteum	S. 1
1.2.	Historischer Abriß der Labormethoden zur Kontrolle der Gelbkörperfunktion	S. 2
1.2.1.	Pregnandiol im Harn	S. 2
1.2.1.1.	Methoden	S. 2
1.2.1.2.	Ergebnisse	S. 4
1.2.2.	Progesteron im Harn	S. 5
1.2.3.	Progesteron im Plasma	S. 6
1.2.3.1.	Photometrische, gaschromatographische und Doppelisotopeverdünnungs-Methoden	S. 6
1.2.3.2.	Proteinbindungsmethoden	S. 8
1.3.	Fragestellung	S. 11
2.	Methode und Methodendiskussion	S. 16
2.1.	Material	S. 16
2.2.	Methode	S. 18
2.3.	Methoden- und Fehlerdiskussion	S. 19
2.3.1.	Reinheitsgrad der Glasgeräte-Einmalgläser	S. 19
2.3.2.	Einfluß auf die Bindungskapazität der CBG-Lösung durch Veränderung der verschiedenen Variablen	S. 21
2.3.2.1.	Einfluß des CBG-Plasmas	S. 21
2.3.2.2.	Einfluß durch unterschiedliche Verdünnung des CBG-Plasmas	S. 24
2.3.2.3.	Einfluß durch die Inkubationszeit	S. 28
2.3.3.	Trennung von proteingebundenen von ungebundenen Steroiden	S. 23
2.3.4.	Standardkurve	S. 32
2.3.5.	Zuverlässigkeitskriterien	S. 34
2.3.5.1.	Spezifität	S. 34
2.3.5.2.	Genauigkeit	S. 36
2.3.5.3.	Empfindlichkeit	S. 36
2.3.5.4.	Wiederfindung	S. 37
3.	Ergebnisse	S. 38

3.1.	Normalzyklen	S. 38
3.2.	Verlängerte Zyklen	S. 42
3.3.	Ovulationsauslösung	S. 45
3.4.	Gravidität	S. 47
4.	Diskussion	S. 49
4.1.	Normalzyklen	S. 50
4.1.1.	Gelbkörperphase	S. 50
4.1.2.	Follikelphase	S. 54
4.2.	Verlängerte Zyklen	S. 55
4.3.	Ovulationsauslösung	S. 57
4.4.	Gravidität	S. 58
5.	Abschließende Beurteilung der Methode und ihrer klinischen Anwendbarkeit	S. 61
6.	Zusammenfassung	S. 67
	Literaturverzeichnis	S. 69
	Lebenslauf	S. 78

1. Einleitung

1.1. Das Corpus luteum

Der Gelbkörper, der nach der Ovulation aus dem Follikel entsteht, ist ein Teil des innersekretorischen Apparates des Ovars. 1934 (a + b) berichteten u.a. BUTENANDT und seine Mitarbeiter über die erfolgreiche Isolierung und Aufklärung der chemischen Struktur des wirksamen Prinzips des Corpus luteum, des Progesteron. Der systematische Name ist Δ^4-Pregnen-3,2o-dion, die Struktur ist folgendermaßen zu kennzeichnen:



Im normalen Menstruationszyklus der Frau bewirkt das Progesteron die sekretorische Umwandlung des durch die Oestrogene aufgebauten Endometrium. Es schafft damit einerseits die wesentliche Voraussetzung für einen normalen Funktionsablauf im weiblichen Genitalzyklus, andererseits ist dieser Vorgang notwendig für das Eintreten einer Schwangerschaft.

Zum Erkennen von Störungen in diesem Bereich hat der Gynäkologe eine Reihe von diagnostischen Möglichkeiten an der Hand, die zunächst indirekte Parameter waren:
Die Basalttemperaturkurve, die Beschaffenheit des Zervikalsekretes, die Kolpozytologie, die Endometriumbiopsie (STEMMLER 1969).

Wunsch und Ziel der Bemühungen war es seit jeher, diagnostische Verfahren zu entwickeln, die die Störungen an der verursachenden Stelle bzw. an deren Produkten erkennen ließen. In der Frage nach der Funktion des Gelbkörpers gelang dies zunächst mit Hilfe der Bestimmung von Pregnandiol (5ß-Pregnan-3a,2oa-diol) im Urin, dem wichtigsten Stoffwechselprodukt des Progesteron.

Während die Biosynthese von Progesteron über Cholesterin und Pregnenolon (Pregn-5-en-3ß-ol-2o on) geht (v.d. MOLEN und AAKVAAG 1967), sind die Hauptstufen des Abbaues, d.h. wichtigsten Metabolite: 2oa-Hydroxypregn-4-en-3-on und überwiegend Pregnandiol über 5ß-Pregnan-3,2o-dion und 5ß-Pregnan-3a-ol-2o-on (DORFMAN und UNGAR 1965).

Im Zuge der weiteren Entwicklung gelang dann die Quantifizierung von Progesteron im Plasma; diese Arbeit wird von der Anwendung einer solchen Methode und den mit ihr gemachten Erfahrungen berichten.

Die Bestimmung von Pregnandiol bzw. Progesteron bietet gegenüber den genannten indirekten Verfahren den Vorteil, daß neben einer sicheren qualitativen Aussage - dem Vorhandensein von Gelbkörperhormonen - eine quantitative möglich ist. Auch ist damit der Wechsel von verschiedenen Zyklusphasen erkennbar. Beides hat - und dies zu zeigen, wird eine weitere Aufgabe der vorliegenden Arbeit sein - eine erhebliche Verbesserung der diagnostischen Möglichkeiten zur Folge.

1.2. Historischer Abriß der Labormethoden zur Kontrolle der Gelbkörperfunktion

1.2.1. Pregnandiol im Harn

1.2.1.1. Methoden

Im Jahre 1937 veröffentlichte VENNING die erste Methode, mit deren Hilfe das Natriumsalz von Pregnandiolglucuronid gravimetrisch bestimmt wurde. 4 Jahre später erschien von ASTWOOD und JONES (1941) eine weitere Arbeit über eine gravimetrische Methode, die die Empfindlichkeitsgrenze um ungefähr den Faktor 1o auf 1 - 3 mg/24 h senken konnte. Damit war der Trend in der Methodologie zunächst abgesteckt, denn in den folgenden 15 Jahren ging es um eine Steigerung der Empfindlichkeit. Dieses wurde zunächst ebenfalls im Jahre 1941 durch TALBOT u.a. durch die Veränderung im Bestimmungsprinzip erreicht. Diese Autoren maßen Pregnandiol nach Säurehydrolyse und einigen Reinigungsschritten kolorimetrisch durch die dem Pregnandiol eigene UV-Adsorption bei 42o nm, die untere Meßgrenze war bei ca. o,1 mg.

1955 begann eine zweite Etappe in der Geschichte der Pregnandiol-Bestimmungen. KLOPPER u.a. konnten durch die Einführung von zwei Säulenchromatographien und einer Azetylierung zwar die Empfindlichkeit nicht entscheidend verbessern - die Endbestimmung erfolgte ja immer noch

kolorimetrisch - aber er erreichte eine größere Spezifität der in die qualitative Messung eingehenden Substanzen.

1958 führten EBERLEIN und BONGIOVANNI zur Reinigung des Urinextraktes, der das durch Enzymhydrolyse freigesetzte Pregnandiol enthielt, eine Papierchromatographie ein, die insbesondere eine Vereinfachung des Analysenganges und der Beibehaltung der Spezifität erhoffte: "... KLOPPER reported a still more elaborate method." LIPP (1960) kombinierte beide Verfahren - Säulen- und Papierchromatographie - und glaubte, dadurch eine bessere Spezifität und Genauigkeit bzw. Richtigkeit besonders in den unteren Bereichen, d.h. während der Follikelphase des weiblichen Menstruationszyklus zu erreichen, eine Annahme, die SZEREDAY und SCHNEIDER (1965) in einem Vergleich beider Methoden bestätigen konnten.

Ein Nachteil der KLOPPER-Methode und aller ihrer bis dahin veröffentlichten Modifikationen war der relativ aufwendige Analysengang, der höchstens ca. 20 Bestimmungen pro Woche von einer Arbeitskraft ermöglichte. WALDI (1962) wollte das Verfahren durch den Vergleich von angefärbten Pregnandiolflecken auf DS-Platten mit Flecken von bekannten Mengen Pregnandiol vereinfachen. Aber seine Methode war höchstens als semiquantitativ anzusehen und konnte sich gegenüber den vorher bekannteren, genaueren nicht durchsetzen, obwohl 1965 von KELLER die Methode in modifizierter Form wieder aufgegriffen wurde.

Eine weitere Veränderung wurde von STAUB u.a. 1962 angegeben, die die Reinigung mittels Glasfiber-Papierchromatographie durchführten. Dadurch konnte eine Verkürzung des Verfahrens erlangt werden, so daß 50 Bestimmungen in der Woche durchgeführt werden konnten.

Durch JONES u.a. (1962), WOTIZ (1963) und RAMAN u.a. (1965) begann für die Pregnandiolbestimmung eine neue Aera: Diese Autoren benutzten für die Quantifizierung von freiem

Pregnandiol, Pregnandiol-Diacetat bzw. Pregnandiol-Trimethylsilyläther gas-chromatographische Verfahren. Damit war neben der Erhöhung der Spezifität (HAMMERSTEIN und ZIELSKE 1968) eine deutliche Empfindlichkeitssteigerung um wiederum den Faktor 1o auf ca. o,o1 mg gegeben.

Seit der Einführung der Gaschromatographie ist eine entscheidende Veränderung in der Methodologie der Pregnandiolbestimmung nicht eingetreten; verschiedene gaschromatographische Verfahren einerseits z.T. mit dem Versuch, die Analysen abzukürzen (WEISS 197o und van de CALSEYDE u.a. 197o) und die Bestimmung auf der Basis der UV-Adsorption (zuletzt: KRAIEN u.a. 1969) sind z.Zt. im Gebrauch; wobei, wenn ein Labor die Möglichkeit zur Gaschromatographie hat, diesen Verfahren insbesondere wegen ihrer besseren Spezifität der Vorzug zu geben ist (HAMMERSTEIN und ZIELSKE 1968).

1.2.1.2. Ergebnisse

Aus der Tabelle 1 kann man die Fortschritte, die im Laufe der Zeit in der Methode zur Pregnandionbestimmung eingetreten sind, in ihrem Einfluß auf die Ergebnisse ersehen. Dieses betrifft verständlicherweise insbesondere die Ausscheidung in der Follikelphase des weiblichen Zyklus als der Zeit, in der die Pregnandiolausscheidung am geringsten ist:

Während man mit der Gravimetrie keine Aussage über die Follikelphase machen konnte, erlaubte die Kolorimetrie die Messung in diesem Teil des Zyklus. Allerdings ist deutlich sichtbar, daß mit zunehmender Verfeinerung der Methode die Werte sinken und damit - da eine ähnliche Tendenz bei den Gelbkörperphasenwerten nicht erkennbar ist - die Differenz zwischen prae- und postovulatorischen Werten.

T A B E L L E 1

Urinpregnandiol-Ausscheidung mg / 24 h

Methode	Foll.-Phase	C.-luteum-Phase	Autor
Gravimetrie	--	1.5 - 8.o	VENNING und BROWNE (1937)
Photometrie	o.78 - 1.5	2.1 - 4.2	KLOPPER u.a. (1955)
D.-Isotop. V.	1	o.6 - 9.o *	EHRLICH (1965)
Gaschromat.	o.2 - 1.5	o.8 - 4.1	LUCIS u.a. (1968)
Gaschromat.	o.15 - o.57	o.8 - 5.1	GOEBELSMANN u.a.(1969)

*) Aus einer Zeichnung entnommen

1.2.2. Progesteron im Harn

Nachdem schon 1937 Pregnandiol als der wichtigste Metabolit von Progesteron im Harn meßbar war, war die Suche nach dem ursprünglichen Gelbkörperhormon im Harn erst 1966 von ISMAIL und HARKNESS erfolgreich, wenn man von der Isolierung und unabhängig davon durch SCHUBERT u.a. 1966 im Harn eines Mannes mit Nasen-Rachen-Fibrom und einer Astheno-Hypospermie absieht. SCHUBERT konnte allerdings schon zeigen, daß die Ausscheidung bei diesem Patienten anstieg nach einer Therapie mit menschlichem Choriongonadotropin.

Es war dann hauptsächlich die Arbeitsgruppe von SCHUBERT (SCHUBERT u.a. 1967a, SCHUBERT u.a. 1967b, SCHUBERT u.a. 1969), die versuchte, mit aufwendigen Analysenverfahren genauere Aussage über den Progesterongehalt des Harn zu machen.

1969 veröffentlichten sie folgende Werte:

Frauen (22. Zyklustag)	514 ng/24 Std (11o - 98o)
Männer	24o ng/24 Std (4o - 52o)
Frauen (Gravidität 1. Woche vor Partus)	4o5o - 645o ng/24 Std.,

die sie auf Grund einer Aufarbeitung, die neben der Ätherextraktion, fraktionierte Hydrolysen und Girard-Trennung von je einer Säulen-, Papier- und Dünnschichtchromatographie gekennzeichnet war, die Endbestimmung erfolgte durch Gaschromatographie und massenspektrometrisch.

v.d. MOLEN und CORPECHOT(1968)haben die Ergebnisse von Schubert bestätigt, und sie konnten zudem zeigen, daß die Ausscheidung nach Gabe von radioaktiv markiertem Progesteron bei ca. o.oo1% der Ausgangsmenge liegt.

Neben der Aufwendigkeit dieses Verfahrens, das allein für wissenschaftliche Zwecke gerechtfertigt erscheint, zeigen auch die gefundenen Ergebnisse, daß die Ausscheidung von Progesteron im Harn dem Kliniker kaum auf seine Fragestellungen befriedigende Antworten geben kann.

1.2.3. Progesteron im Plasma

1.2.3.1. Photometrische, gaschromatographische und Doppelisotopenverdünnungs-Methoden

Nachdem 1953 EDGAR unter dem Titel "The chemical assay of progesterone" die erste Arbeit über eine erfolgreiche physiko-chemische Methode zur Bestimmung von Progesteron im Plasma veröffentlichte, die auf der UV-Adsorption von Progesteron beruhte, waren es ZANDER und SIMMER (1954), die mit dem gleichen Prinzip, aber mit besserer Vorreinigung Progesteron einigermaßen zuverlässig bestimmen konnten. Diese Methode hatte eine untere Empfindlichkeitsgrenze von 5o ng/ml Blut (ZANDER 1954) und erlaubte die Bestimmung von Progesteron im Blut von schwangeren Frauen. SOMMERVILLE (1957) und SOMMERVILLE und DESHPANDE (1958) benutzten die UV-Adsorption von isonicotinsaaurem Hydrazon-Derivat des Progesteron zur quantitativen Bestimmung. SHORT (1958) verkürzte dies etwas umständliche Verfahren von ZANDER (1954) und damit konnten die Methoden zur Routineanwendung gelangen (van der MOLEN und AAKVAAG 1967).

TOUCHSTONE und MURAVEC (196o) beschrieben eine Methode, die eine Derivatbildung des Progesteron nach Behandlung mit methanolischer Kalilauge und nachfolgender fluorometrischer Bestimmung mit 8o % H_2SO_4 beinhaltete. SHORT und LEVETT(1962)gaben damit Progesteronwerte im weiblichen Zyklus an, LANGENBACH und KNOCHE(1968)erkannten im Derivat Pregn-4en –3,6,2o-Trion.

Neben dem Prinzip der Spektrophotometrie bzw. Fluoreszenz gibt es ab 1963/64 zwei weitere Methoden in der quantitativen Endbestimmung: die Doppelisotopenverdünnung und die Gaschromatographie.

Zunächst erschien 1963 von den Autoren WOOLEVER und GOLDFIEN eine Progesteron-Bestimmungsmethode, die mit ^{14}C-Progesteron als internem Standard und einem Natriumbohrhydrid -^{3}H-Derivat arbeiteten. Sie hatte eine Empfindlichkeit von zunächst 1oo ng. RIONDEL u.a. (1965) beschrieben eine ähnliche Methode, die ^{3}H-Progesteron und ^{35}S-Thiosemicarbazid benutzten. Schließlich waren es WIEST u.a. (1966) und WIEST (1967), die ^{14}C-Progesteron und das ^{3}H-Essigsäureanhydrid-Derivat von 2o ß-Hydroxypregn-4-en-3-on in die Methode einführten.

Nachdem KUMAR u.a. (1962) zum ersten Mal mit Hilfe der Gaschromatographie Progesteron aus dem menschlichen Myometrium von schwangeren Frauen identifiziert hatten und FUTTERWEIT u.a. (1963) eine Methode zur Bestimmung von Progesteron im menschlichen Schwangerenplasma beschrieben hatten, veröffentlichte 1964 YANONE u.a. eine Bestimmung von Progesteron im menschlichen Plasma, die Empfindlichkeit gaben sie mit 1o bis 2o ng an; sie benutzten bei der Quantifizierung des unveränderten Progesteron einen Flammen-Ionisations-Dedektor, in ähnlicher Weise mit veränderten Reinigungsschritten bestimmte LURIE u.a. 1966 Progesteron im Plasma mit einer Empfindlichkeit von 1o ng. COLLINS und SOMMERVILLE (1964) beschrieben eine Methode mit einem Argon-Ionisations-

Dedektor bei einer Empfindlichkeit von 1o ng. Van der MOLEN und GOEN (1965) bildeten aus dem an der 2o ß-Stellung reduzierten Progesteron ein Chlorazetat-Derivat, das ihnen die Endbestimmung mit Hilfe eines "electron-capture"-Detektors ermöglichte. Die Empfindlichkeit war bezogen auf das Chlorazetat-Derivat 1 - 5 ng.

WYMAN und SOMMERVILLE (1968) azetylierten das extrahierte Progesteron und bestimmten es quantitativ mit einem Flammen-Ionisations-Dedektor in einer Empfindlichkeit von 5 - 1o ng.

1.2.3.2. Proteinbindungsmethoden

B.E.P. MURPHY u.a. beschrieben 1963 zum ersten Mal eine Methode zur Bestimmung von Plasma-Kortikoiden, die auf einer schon bekannten Tatsache beruhte: insbesondere Steroidhormone gehen im Plasma mit dort vorhandenen Proteinen reversible Bindungen ein. Diesen Umstand nützend, entwickelten sie eine Methode zunächst für Kortikoide (MURPHY u.a. 1963) und später für andere Steroide (MURPHY 1967), die folgende Prinzipien beinhaltete (s. Abb. 1):

1. Herstellen einer Lösung, die ausreichend möglichst nur ein Protein enthält, das spezifisch ein Steroid oder eine Gruppe von ähnlichen Steroiden reversibel bindet.
2. Besetzen der freien Bindungsstellen des Proteins mit einem markierten Steroid mit möglichst hoher spezifischer Aktivität.
3. Herstellen eines Plasmaextraktes, der keine Proteine enthält und, falls vom Bindungsprotein mehrere Steroide gebunden werden, nur jenes, das durch die Methode bestimmt werden soll.
4. Zusammenbringen des mit dem radioaktiven Steroid gebundenen Proteins mit dem Plasmaextrakt zum Erreichen eines neuen Äquilibirium, d.h. das Steroid aus dem Plasmaextrakt verdrängt z.T. das markierte Steroid aus der Proteinbindung.

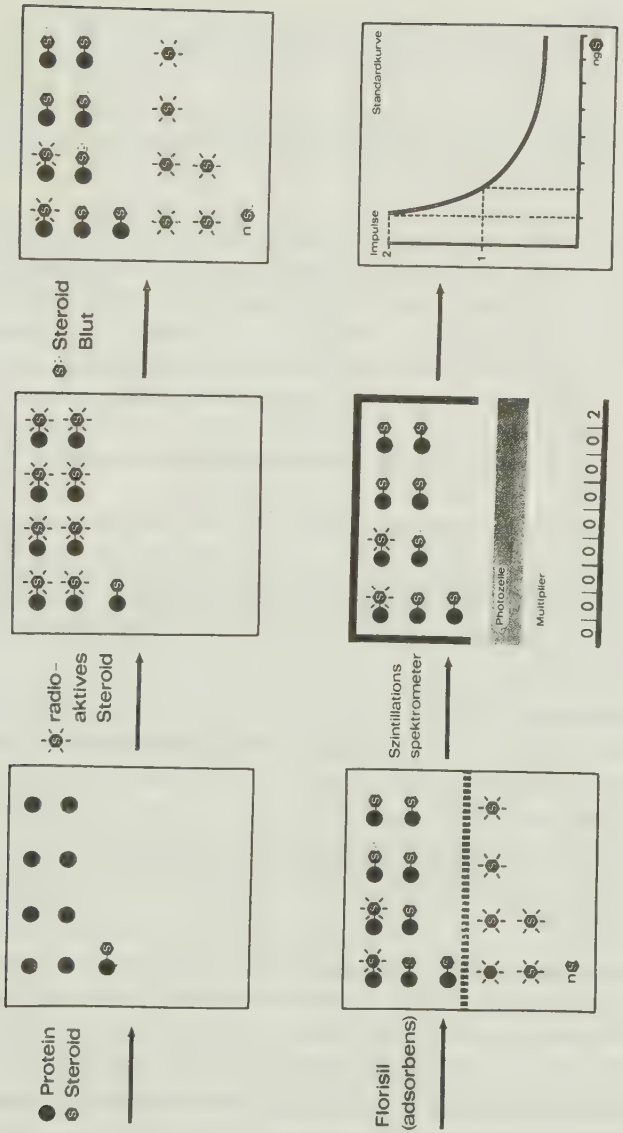


Abb. 1: Prinzip der Protein-Verdrängungsmethode

5. Trennung der freien von den an Protein gebundenen Steroiden und Radioaktivitätsmessung einer Fraktion (oder beide).

6. Ein Vergleich der unbekannten Proben an einer vorher erstellten Eichkurve, die mit bekannten Mengen des Steroid erstellt wurde.

Nachdem MURPHY und mit ihrer Arbeitsgruppe in drei Arbeiten (1964a, 1964b und 1967) ausführliche grundsätzliche Überlegungen zu dieser neuen Art, Steroide zu bestimmen, und in ihrer letzten Arbeit (MURPHY 1967) eine kurze Beschreibung einer Methode zur Bestimmung von Progesteron im Plasma veröffentlicht hatte, waren es zunächst NEILL u.a. (1967), die diese Methode weiter entwickelten, sie ausführlich beschrieben und einer Methodenkritik unterwarfen.

Diese Methode beinhaltete im einzelnen folgende Schritte:

1. Herstellung einer Proteinlösung (für Progesteron kam das Protein Transcortin oder Cortisol-Bindungsglobulin (CBG) in Frage) aus 2,5 ml Hundeplasma in 1oo ml Aqua destillata.

2. Dazu 25 ng Corticosteron-1,2-^{3}H.

3. o,5 bis 1,o ml Plasma, dessen Progesteron-Gehalt ermittelt werden soll, wird mit 5 ml Petroläther (Siedepunkt 3o bis 6o^{o} C) extrahiert.

4. Dünnschicht-Chromatographie mit Äther-Benzol 2:1, Elution der Progesteronbezirke, Vertreiben des Lösungsmittels.

5. In jedes Röhrchen mit dem gereinigten und eingedampften Plasmaextrakt und in die Röhrchen mit bekannten Mengen Progesteron zur Erstellung einer Standardkurve werden 1 ml der CBG-Corticosteron-^{3}H-Lösung einpipettiert.

6. Nach Inkubation und Abkühlung Abtrennung der ungebundenen Steroide mit 8o mg Florisil, Überführen eines Aliquots zur Szintillationsmessung.

Bis Mitte 1970 erschienen insgesamt weitere 9 Modifikationen dieser Methoden (YOSHIMI und LIPSETT 1968, SURVE u.a. 1968, JOHANSSEN u.a. 1968 bzw. JOHANSSEN 1969a, RAO und ESTER GREEN 1969, OBST und SEAMARK 1970, MARTIN u.a. 1970, REEVES u.a. 1970, YUSSMAN und TAYMOR 1970, HOPPER und TULLNER 1970), die sich im wesentlichen in der Art des verwendeten CBG-Plasmas und in den Reinigungsschritten unterscheiden (siehe Tabelle 2). Angewandt wurden diese Methoden auf die Bestimmung von Progesteron im menschlichen Plasma (z.B. NEILL u.a. 1967), im Plasma von Kühen (SURVE u.a. 1968), Rhesusaffen (z.B. JOHANSSEN u.a. 1968 und KIRTON u.a. 1970), Schafen (OBST und SEAMARK 1970), Schweinen (TILLSON u.a. 1970).

Wie schon bei den Ergebnissen der Pregnandiol-Bestimmung zu bemerken war (s. 1.2.1.2), kann man den methodischen Fortschritt insbesondere an den Ergebnissen ablesen (s. Tabelle 3a und 3b). Bei der Bestimmung von Progesteron im Plasma zeigt sich in beiden Abschnitten des weiblichen Zyklus eine gleichlautende Tendenz zu niedrigeren Werten. Dies ist sicher ein Ausdruck der zunehmend größer werdenden Spezifität der Substanzen, die in die Endbestimmung eingehen. Da insbesondere auch die Proteinbindungsmethoden ihre Schwierigkeiten im unteren Bereich haben - so schreibt z.B. YOSHIMI und LIPSETT 1968:"We have compared their method (NEILL 1967) with ours and find it to be satisfactory in the range likely to be encountered during the luteal phase."-, wird es sich in einiger Zeit unter verbesserten Bedingungen dieser Methoden oder evtl. einer noch zu entwickelnden neuen zeigen, ob mit den angegebenen Werten (ca. 0,4 ng/ml) die wirkliche Menge an Progesteron in der Follikel-Phase bzw. beim Mann ausgedrückt ist.

3. Fragestellung

In dieser Arbeit werden Erfahrungen, die mit der von JOHANSSON (1969a) veröffentlichten Modifikation der Protein-Bindungsmethode zur Bestimmung von Progesteron im menschlichen Plasma gemacht worden sind, beschrieben. Diese

TABELLE 2

CBG-Stammlösung	Verdünnung	"tracer"-Steroid	Plasmaextraktion	Chromatographie	Abtrennung	Leerwert (ng)	Autor
Mann	2,5 %	Corticosteron	1 x Petroläther	DS Äther/Benzol 2:1	80 mg Florisil	"0"	NEILL u.a. (1967)
Ovarektom. Frau m. Östrogen- und Dexamethason-Behandlung	1 % in Phosphatpuffer	Progesteron	2 x Äther (alkalisiertes Plasma)	DS Benzol Äthylacetat 60:40 +Alum.-Sil.Säule	Sephadex-Säule	0,05	YOSHIMI u.a. (1968)
Mann	5 %	Corticosteron	Petroläther	DS Chloroform-Aceton 95:5			SURVE u.a. (1968)
Frau mit Östrogenbehandlung	0,05 %	Corticosteron	1 x Petroläther		80 mg Florisil	0,03	JOHANSSON (1969a)
Mann mit Dexamethasonbehandlung	2,5 % in steril. dopp. ionis. H_2O	Corticosteron	2 x Petroläther	wie NEILL	Florisil	ohne Angabe	RAO u.a. (1969)
Tegschenne	ohne Angabe	Cortisol	Protein Denat. Petroläther	ohne Angabe	Sephadex-Säule	ohne Angabe	OBST u.a. (1970)
Mann mit Östrogenbehandlung	2,5 %	Corticosteron	2 x Äthylacetat	Papierchromat. Petroläther/ Methanol 5:4:1	80 mg Florisil	0,055 ± 0,001	MARTIN u.a. (1970)
ovarektom. Frau mit Östrogen-u. Dexamethasonbehandlung	0,2 %	Corticosteron	2 x Petroläther	DS Äther/Benzol 2:1	40 mg Florisil	0,06 ± 0,06	REEVES u.a. (1970)
Frau mit Östrogenbehandlung	ohne Angabe	Corticosteron	Petroläther	DS Äther/Benzol 2:1			Yussmann u.a. (1970)
ovarektom. Frau Östrogen- und Dexamethasonbehandlung	0,50 % in Phosphatpuffer	Progesteron	2 x Petroläther	DS Äther/Benzol 2:1	3 mg Florisil (in 0,2 ml CBG-Lösung)	"0"	HOFFER u.a. (1970)

TABELLE 3[a]

Ergebnisse (Progesteron im Plasma)

Follikelphase (ng/ml)

Zeitraum	Ergebnisse	method. Prinzip	Autor
7.-12. Tag post menst.)bei 9. Tag " ")ver- 12. Tag " ")schied.)Indiv.	50 36 25	Spektrophotometrie	OERTEL u.a. (1959
"Follikel-Phase"	11 - 23	Fluoreszenz	SHORT u.a. (1962)
"praeovulatorisch"	1,7 (0-5,3)	Doppelisotopen-Verdünnungsmeth.	WOOLEVER (1963)
1. Woche des Menstr. Zyklus 2. Woche " " "	0,5 1,2	Gaschromatographie m. "electron-capture"	van der MOLEN u.a (1965)
8.-10. Tag (Pool)	1,15	Doppelisotopen-Verdünnung	RIONDEL u.a. (1965)
8.-10. Tag	0,8 (0,3-2,9)	Gaschromatographie als Progesteron-Acetat m. Flamm. ionis. Dedektion	WYMAN u.a. (1968)
"Follikel-Phase"	0,4 (0,2-1,8)	Protein-Verdräng. Methode	NEILL u.a (1967)
"Follikel-Phase"	0,43±0,37 (0,05-1,5)	Protein-Verdräng. Methode	YOSHIMI u.a. (1968)
3. Zyklus Tag bis 3 Tage v. LH-Maximum	0,32±0,25	Protein-Verdräng. Methode ohne Dünnschicht	JOHANSSON (1969a)

TABELLE 3[b]

Ergebnisse (Progesteron im Plasma)

Corpus-luteum-Phase (ng/ml)

Zeitraum	Ergebnisse	methodisches Prinzip	Autor
15.Tag post menst.)bei ver- 21.Tag " ")schied.)Individ.	32 47	Spektrophoto-·metrie	OERTEL u.a. (1959
"Corpus-luteum-Phase"	18 - 23	Fluoreszenz	SHORT u.a. (1962)
18.27. Tag	9 - 39	Spektrophotometrie v. Thiosemicarbazon Derivat	SOMMERVILLE u.a.(1963)
"postovulatorisch"	6 - 21	Doppelisotopenverdünnung	WOOLEVER (1963)
3. Woche 4. Woche	15,2 7,1	Gaschromatographie ("electron-capture")	van der MOLEN u.a. (1965)
17.-20. Tag (Pool)	7,2	Doppelisotopenverdünnung	RIONDEL u.a. (1965)
17.-20. Tag	11,5	Gaschromatographie v.Progesteron-Acetat m. Flamm.ionid.Dedektion	WYMAN u.a. (1968)
Corpus-luteum-Phase ("Maximum")	10 - 19	Protein-Verdräng. Methode	NEILL u.a. (1967)
Corpus-luteum-Phase ("peak")	6,1 10	Protein-Verdräng. Methode	YOSHIMI u.a. (1968)
Corpus-luteum-Phase (Maximum in 20 Zyklen)	10	Protein-Verdräng. Methode ohne Dünnschicht	JOHANSSON (1969a)

Methode unterscheidet sich von allen anderen insofern wesentlich, als sie auf einen chromatographischen Reinigungsschritt verzichtet. Sie erkauft sich durch einen Verlust an Spezifität - JOHANSSON u.a. (1968) sprechen in diesem Zusammenhang von einer "progestin"-Bestimmung - eine Zunahme an Schnelligkeit und Praktikabilität. Es wird Aufgabe dieser Arbeit sein zu zeigen, wie sich diese Tatsache auf die Beantwortung der verschiedenen klinischen Fragestellungen auswirkt. In der Sprechstunde des gynäkologischen Endokrinologen, der sich auch vorzüglich mit Sterilitätsfragen beschäftigt, benötigt man Aussagen:

1. Über das Stattfinden einer Ovulation, möglichst deren Terminierung,
2. über die innersekretorische Aktivität des Corpus luteum in Dauer und Intensität,
3. über den Erfolg einer ovulationsauslösenden Therapie,
4. über die endokrine Situation bei Hormonstörungen,
5. über die Prognose einer Gravidität bzw. eines drohenden Abortes.

Zunächst aber sollen im Zusammenhang mit eigenen Erfahrungen auf die vorhandenen methodischen Schwierigkeiten hingewiesen werden - Schwierigkeiten, die sich zum einen aus dem neuartigen Bestimmungsprinzip, zum anderen aus der Messung von Hormonmengen im unteren Nanogrammbereich ergeben. Daß diese Schwierigkeiten auch bei anderen Autoren auftreten und somit den Methoden immanent sind, läßt sich allein schon aus der relativ großen Zahl von Modifikationen erkennen, die in den vergangenen 3 Jahren publiziert worden sind (s. Tab. 2).

2. Methode und Methodendiskussion

2.1. Material

Chemikalien

Petroläther p.a., SP. 4o - 6o° C von Firma Merck Batch 9676152 wurde bei uns redestilliert und der Siedebereich von 4o - 5o° C weiterverwandt.

Methanol p.a. von Firma Merck ohne weitere Behandlung.

Aqua dest. ist bei uns am Ionenaustauscher entsalzt und danach doppelt destilliert.

Florisil von Firma Serva, 6o - 1oo mesh, wird vor Gebrauch viermal mit Aqua destillata gewaschen mit relativ raschem Abgießen des Überstandes. Danach wird es über Nacht bei 1oo° C getrocknet.

Progesteron zur Erstellung einer Standardkurve kommt als authentische Reinsubstanz von der Firma Schering und wurde von uns ohne weitere Vorreinigung benutzt. Die Reinheit wird gaschromatographisch überprüft.

Corticosteron - 1,2-^{3}H, New England Nuclear Corporation (NEN) Spezifische Aktivität: 4o - 5o C/mMol, wurde in kleineren Mengen von der Stammlösung durch Dünnschichtchromatographie mit dem System Äthanol-Chloroform 2o/8o gereinigt und mit Methanol eluiert und längstens 1 Monat aufbewahrt.

Andere radioaktiv markierten Steroide, die zu den Wiederfindungsversuchen verwandt wurden, kamen von "The Radiochemical Centre, Amersham".

Geräte

Reagenzglasschüttler: Mixomat von Firma Boskamp.
In diesem zweidimensionalen Schüttler werden die Röhrchen nach dem Zugeben des Florisils geschüttelt.

Szintillationsmesser: Packard-Tricarb Liquid Szintillation-Spektrometer Modell 574.

Wasserbäder: Firma Köttermann, ein Gerät mit Schüttelvorrichtung zum Schütteln im Eisbad.

Mikropipetten: Marburg-Mikropipette der Firma Eppendorf.

Plasma: Es wurde den Patientinnen bzw. Frauen, die keinerlei Störungen ihrer ovariellen Funktion zeigten, in der Regel das Blut vormittags entnommen, sie waren nicht nüchtern, und die Zeit ist dokumentiert worden. Da RUNNEBAUM (7o) zeigen konnte, daß es keine Tagesschwankungen des Progesteron-Spiegels im Zyklus und während der ersten Monate der Schwangerschaft gibt, haben wir darauf verzichtet, einen definierten Zeitpunkt der Blutentnahme festzulegen.

Es wurden 5 ml Blut entnommen, die sofort in ein Röhrchen mit Heparin (Vetren-o,2 ml entspricht 2o E-) überführt wurden. Das Röhrchen wurde dann sanft mehrfach geschüttelt und sofort in einen Kühlschrank bei 4^{o} C gestellt. Innerhalb von längstens 12 Stunden (s.dazu JOHANSSON 69a) wird dann durch 1ominütiges Zentrifugieren bei 3ooo Umdrehungen/min. das Plasma von den corpusculären Anteilen getrennt, abgehoben und bei ca. $-2o^{o}$ C tiefgekühlt aufbewahrt.

2.2. Methode (in enger Anlehnung an JOHANSSON 1969a)

A. Herstellen der CBG-Corticosteron-1,2-H_3-Stammlösung.

1. In 1oo ml Aqua bidestillata werden ca. 15 ng Corticosteron-H_3 (NEN-Radiochemicals, S.A. 5o C/mMol) gelöst.

2. 45 Minuten vor Versuchsbeginn werden o,1 ml Plasma von einer mit Äthinyl-Östradiol und Dexamethason behandelten Frau dazugegeben und sanft geschüttelt.

B. Herstellen der Eichwerte und der Plasmaextrakte.

1. Aus einer Stammlösung werden jeweils 2 Zentrifugenröhrchen (mit spitzem Boden) o,5 - 1,o - 1,5 - 2,o - 2,5 ml einer methanolischen Progesteronlösung mit einer Konzentration von 1 ng/ml sorgfältig einpipettiert. Diese Lösung wird aus der authentischen Reinsubstanz selbst hergestellt.

2. Das Methanol wird im Sandbad bei 4o° C mit Stickstoff bis zum trocknen Rückstand eingedampft.

3. o,2 (bzw. o,1 oder o,o5 bei Schwangerenplasma) ml Plasma mit dem unbekannten Progesterongehalt werden in 2 (bzw. 2 oder 1) ml Petroläther (Merck Batch 9676152, S.P. 4o bis 5o° C) einmal 1 Minute ausgeschüttelt. Nach mindestens 1 weiteren Minute wird der Petrolätherüberstand sorgfältig mit Pasteurpipetten abgesaugt, ohne auch nur geringste Teile des extrahierten Plasmas mit zu überführen.

4. Die Petrolätherextrakte werden ebenfalls im Zentrifugengläschen im Sandbad unter Stickstoff vertrieben.

C. Verdrängungsansatz und Messung.

1. In jedes der vorbereiteten Röhrchen und zusätzlich in 2 Röhrchen, die nicht vorbehandelt sind (als Nullwert), werden 1 ml der CBG-Corticosteron-^{3}H-Stammlösung einpipettiert, geschüttelt und dann für 5 Minuten in ein Wasserbad mit 4o° C gestellt und danach für 1o Minuten in einem Eisbad kräftig bewegt.

2. Die Röhrchen werden einzeln (die anderen verbleiben im Eis) mit ca. 9o mg Florisil (Meßlöffel aus Plastik) 3o sec ausgeschüttelt. Nach weiteren 3o sec werden o,5 ml des Überstandes in ein Gläschen zur Szintillationsmessung abpipettiert. Beide Zeiten sind mit Hilfe einer Stoppuhr sorgfältig einzuhalten.

3. In jedes Szintillationsgläschen werden zusätzlich 14 ml einer Szintillationslösung (in 1oo ml Dioxan, 1oo g Naphthalin, 7 g POP, o3 g Demethyl-POPOP) eingefüllt und in einem Packard-Tricarb-Szintillationsmesser gemessen.

Methoden- und Fehlerdiskussion

1. Reinheitsgrad der Glasgeräte - Einmalgläser

Über einen längeren Zeitraum war in der Anfangsphase in mehreren Röhrchen die Proteinbindung fast vollständig gestört, während andere die erwarteten Werte zeigten. Daraufhin überprüften wir unsere Reinigung der Glasgeräte. Bis zu diesem Zeitpunkt benutzten wir spitze Reagenzgläschen mit Schliff, die nach dem Versuch 24 Stunden unter fließendem Wasser gespült wurden, dann weiter 24 Stunden in ein Chromschwefelsäurebad gelegt wurden, anschließend durchliefen sie den in unserem Labor normalen Waschvorgang: Einweichung in ein Wasserbad mit RBS (basisches Reinigungsmittel mit der Zusammensetzung: in 35 - 4o l Wasser 2oo ml 5o %ige Kalilauge und 5o ml Hypochlorid-Lösung) und maschinelle Reinigung mit klarem entsalzenem Wasser in einem Spülautomaten. Sehr verschmutzte Röhrchen wurden vor der Endreinigung mit Ata gereinigt. Da die Vermutung nahe lag,

daß evtl. durch die Maschinenspülung infolge der ungünstigen Anordnung im Gerät nicht immer das gesamte Reinigungsmittel weggespült wurde, haben wir in 2 Modellversuchen den Einfluß dieser Substanzen auf die Proteinbindung studiert.

a) In die wässrige CBG - B H_3 - Lösung wurde ein Tropfen des Konzentrats gegeben, ein Kontrollansatz lief gleichzeitig mit:
Leerwert mit "RBS" : 1.42o cpm
Leerwert ohne "RBS" : 1.44o cpm
In diesem Modell stört offenbar das Reinigungskonzentrat die Proteinbindung nicht.

b) In einem zweiten Modellansatz wurde das RBS bzw. Ata vor dem Ausschütteln mit Florisil in die Gläschen mit jeweils 3 Eichwerten (0 - 1 - 2 Nanogramm) als Doppelbestimmung nach der Zugabe von CBG - B-^{3}H-Lösung gegeben(Abbildung 2).

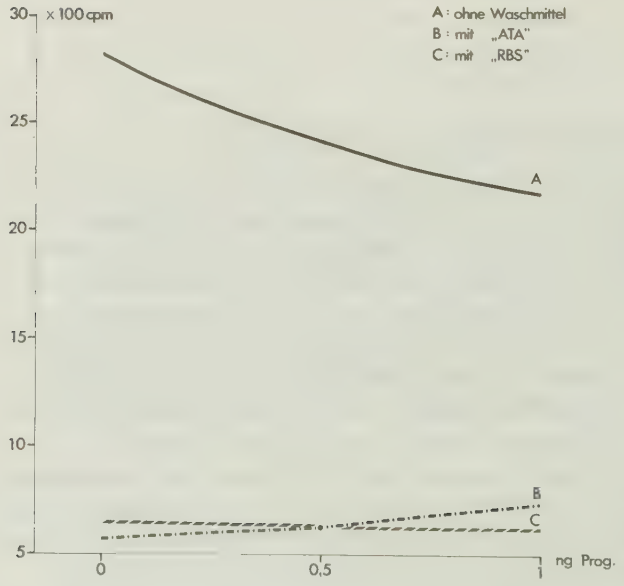


Abb. 2: Einfluß von Reinigungsmitteln auf die Proteinbindung (Meßwerte jeweils bei 0; o,5 bzw. 1 ng)

Aus dieser Abbildung kann man ersehen, daß das Vorhandensein von den beiden zugesetzten Reinigungsmitteln die Proteinbindung so erheblich stört, daß eine Dosis-Abhängigkeit der gebundenen Radioaktivität von dem zugesetzten Progesteron nicht mehr erkennbar ist.

Aufgrund dieser Erfahrung wurden die Schliffgläschen durch Einmal-Röhrchen ersetzt, da sonst die Möglichkeit zur Verunreinigung nicht auszuschließen war. Auch Pipetten werden danach nicht mehr mit Reinigungsmittel zusammengebracht. Diese Erfahrungen haben offenbar auch andere Autoren gemacht, so benutzt auch JOHANSSON (1969a) nur "disposals", obwohl MURPHY (1967) noch schrieb: "Apart from great sensitivity, the particular advantage of these methods is the virtual absence of effect due to nonsteroidal substances, making special preparations of reagents and special handling of glassware unnecessary."
Dieser Satz ist heute sicher nicht mehr aufrechtzuerhalten, so konnte JOHANSSON (7o) eine lange Liste von Substanzen zeigen, die die Proteinbindung erheblich stören.
Eine Störung durch das verwendete Wasser konnte nicht festgestellt werden.

2.3.2. Einfluß auf die Bindungskapazität der CBG-Lösung durch Veränderung der verschiedenen Variablen

2.3.2.1. Einfluß des CBG-Plasmas

Wie aus der Tabelle 1 ersichtlich, ist CBG verschiedenster Herkunft gebräuchlich - vom Hund, von der Legehenne und vom Menschen. Zur Erhöhung des CBG-Anteils im Plasma wird weitgehend eine Vorbehandlung mit Östrogen benutzt sowohl bei gesunden Frauen (JOHANSSON 1969a), (YUSSMAN u.a. 197o), bei ovariektomierten Frauen (YOSHIMI u.a. 1968, REEVES u.a. 197o, HOPPER u.a. 197o), als auch beim Hund (MARTIN u.a. 197o). Meist zusätzlich wird häufig eine Behandlung mit Dexamethason zur Bremsung der endogenen Kortikoidproduktion durchgeführt, auch die Verwendung von Plasma

von ovariektomierten Frauen ist auf das gleiche Bestreben - nämlich Depression des endogenen Steroidspiegels - zurückzuführen. REEVES u.a (1970) sagt dazu:
"The CBG from patients treated with oestrogen + dexamethasone appears to be more sensitive than CBG from patients with oestrogen alone."
Dieses Phänomen ist erklärlich, wenn man annimmt, daß bei konstanter CBG-Menge die Empfindlichkeit mit der Aufnahme des markierten Steroid steigt, und ein weniger mit endogenen Steroiden besetztes CBG mehr Indikator-Steroid binden kann. Aus diesem Grunde haben auch wir CBG-Plasma von einer Frau benutzt, die mit Äthinyl-Östradiol und Dexamethason behandelt worden ist. Diese Empfindlichkeitssteigerung kann man deutlich aus der Abb. 3 entnehmen. Es wurden jeweils gleiche Mengen von Plasma von einer

a) Gravida mens 5,
b) Gravida mens 9,
c) Patientin 7 Tage Östrogenbehandlung,
d) Patientin mit 14 Tage Östrogenbehandlung,
e) Patientin mit 14 Tage Östrogen- und Dexamethasonbehandlung

mit gleichen Mengen Corticosteron - ^{3}H in wässriger Lösung zusammengebracht und die Aufnahme von Corticosteron durch CBG bei 25° C zu verschiedenen Zeiten nach Abtrennung der freien Steroide durch Florisil bestimmt.
Dabei zeigt sich deutlich eine Empfindlichkeitssteigerung von Plasma C über B, A zu D, die wahrscheinlich auf eine Zunahme des CBG-Anteils im Plasma zurückzuführen ist.
Eine noch weitere Steigerung ist dann mit einer zusätzlichen Dexamethason-Behandlung zu erreichen (Plasma e). Hier ist, wie schon erwähnt, wahrscheinlich die Abnahme des endogenen Steroidspiegels die Ursache (mit Sicherheit geht diese Aussage aus dem Versuch nicht hervor, weil das Plasma d und e von verschiedenen Patientinnen stammt, so daß auch ein individuell verschiedener Anstieg des CBG nach der Östrogenbehandlung ursächlich sein könnte).

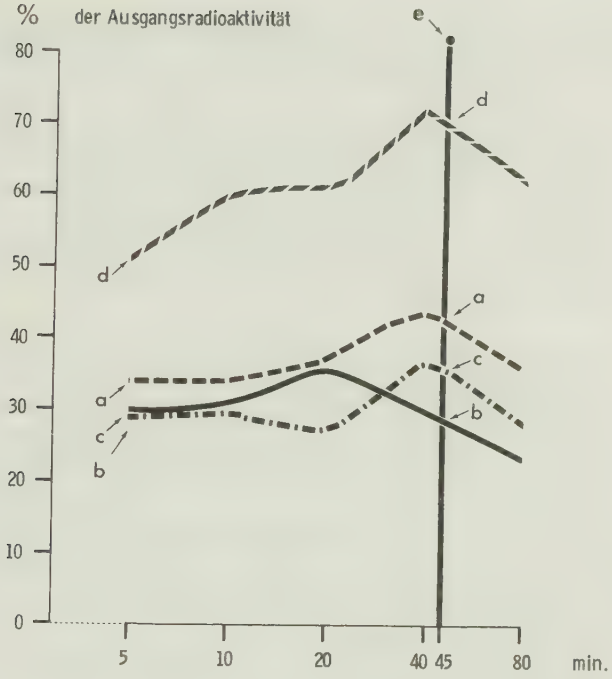


Abb. 3: Aufnahme von Corticosteron-^{3}H durch CBG verschiedener Herkunft z.T. in Abhängigkeit von der Inkubationsdauer (Meßpunkte bei 5, 1o, 2o, 4o und 8o min. bzw. bei 45 min.)

2.3.2.2. Einfluß durch unterschiedliche Verdünnung des CBG-Plasmas

Ein weiteres Problem ist die für jedes CBG-Plasma individuell zu bestimmende Verdünnung der wässrigen Lösung. In diese Suche gehen mehrere Faktoren ein:

1. die Konzentration sollte möglichst gering sein, damit andere Proteine, z.B. Albumine, die ebenfalls Corticosteron und Progesteron reversibel binden, nicht stören (MURPHY 1964), so lange man ein Bindungsprotein nicht isoliert darstellen und verwenden kann.

2. Da durch die Eigenheit der Methoden nur ein relativ kleiner Meßbereich ungefähr vom 1- bis zum 2o-fachen vorhanden ist, sollte dieser übereinstimmen mit den zu erwartenden Werten im Plasmaextrakt.

3. Dieser Meßbereich ist abhängig von der Konzentration in der Weise, daß eine geringere CBG-Konzentration den Meßbereich erniedrigt, d.h. die Methode wird empfindlicher.
MURPHY (1967): "..., greater sensitivity being optained with less CBG."
Andererseits wird bei geringerer CBG-Konzentration auch die Eichkurve im entsprechenden Meßbereich flacher, so daß die Genauigkeit schlechter wird.

Diese Verhältnisse kann man aus den Abbildungen 4 und 5, die die Ergebnisse der Vorversuche zur CBG-Konzentration-Bestimmung sind, ersehen

a) (Abb. 4) bei einer konstant gehaltenen Menge Corticosteron - ^{3}H , die so gewählt ist, daß

- bezogen auf die Radioaktivität in der Endbestimmung - eine ausreichende Empfindlichkeit gewährleistet ist (15 ng auf 1oo ml entsprechen bei einer spezifischen Aktivität von 5o C/mMol ca. 5ooo cpm/o,5 ml bei einer Ausbeute von 25 %), kann man die verschieden starke Aufnahme des Corticosteron durch unterschiedliche CBG-Mengen einerseits und andererseits den verschieden starken Abfall nach Kompetition mit 1 bzw. 2 ng Progesteron erkennen. Es zeigt sich eine ausreichende Aufnahme bei einer Serumverdünnung von 1 %o (ca. 8o %) und ein deutlicher Abfall im gewählten Meßbereich.

b) (Abb. 5) Die Erhöhung der Empfindlichkeit, die durch die Erniedrigung der Plasmakonzentration erreicht wird, verringert deutlich den Neigungswinkel der Standardkurve, so daß die Einzelbestimmung bei gleicher Standardabweichung in der Messung nur mit wesentlich herabgesetzter Genauigkeit durchgeführt werden kann.

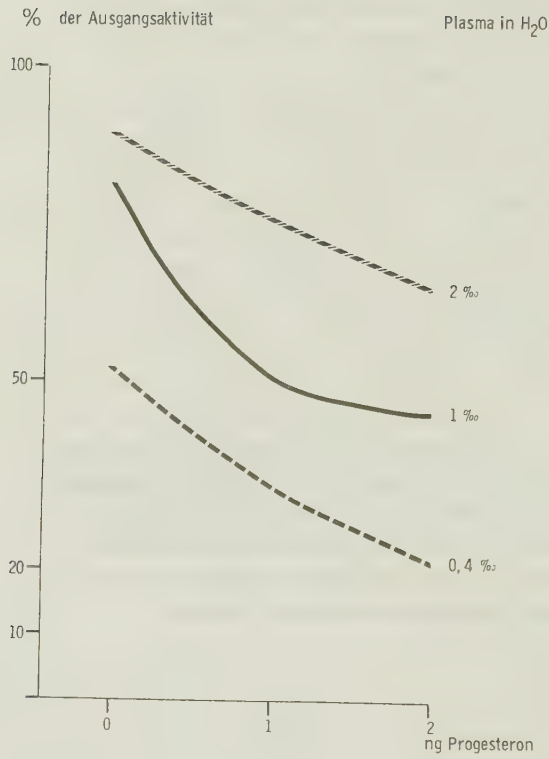


Abb. 4: Abhängigkeit der Corticosteron-^{3}H-Aufnahme und -Verdrängung von der Plasmaverdünnung (Meßpunkte bei o,1 und 2 ng)

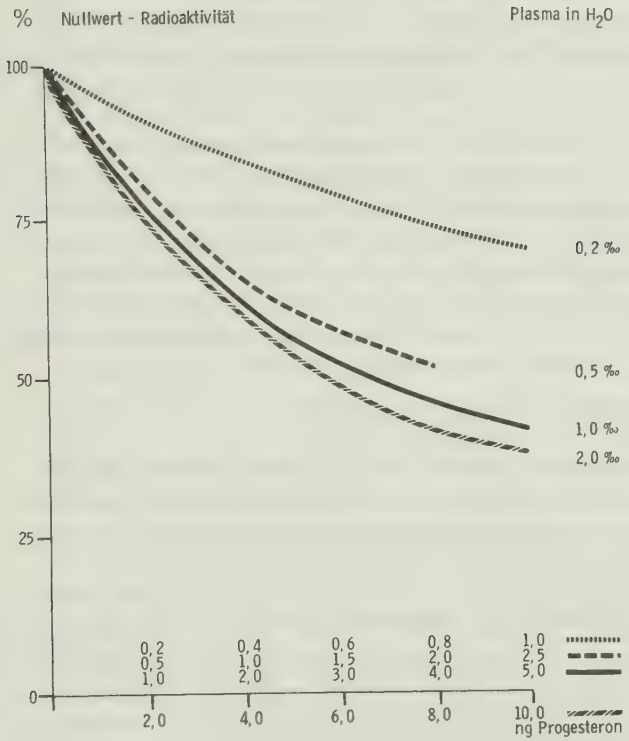


Abb. 5: Abflachung der Eichkurve bei zunehmender Plasmaverdünnung (Meßpunkte an den angegebenen Skalenwerten)

Nach diesen Vorversuchen haben wir unsere Konzentration bei dem Plasma (Patientin E.D., Behandlung mit 0,2 mg Äthinyloestradiol und 2 mg Dexamenthason täglich 14 Tage lang), das wir für die Routinebestimmung eingesetzt haben, auf 1 ‰ bei einer Meßbreite von 0 bis 5 ng festgesetzt.

Dabei wird der Einfluß von Albuminen offenbar keine Rolle spielen, denn JOHANSSON (1969a) konnte zeigen, daß bei einer Plasmakonzentration von 0,5 ‰ der Anteil der Albumine keine Veränderung der Standardkurve bewirkte. Er benutzte als Modell eine Lösung von gereinigtem Humanalbumin in der gleichen Menge, wie sie in 50 µl Plasma vorhanden sind. Die dann gewonnene Standardkurve unterschied sich nicht von der, die mit reinem Wasser erstellt werden kann.

2.3.2.3. Einfluß durch die Inkubationszeit

Die wässrige CBG-Lösung mit dem markierten Indikator-Steroid ist nur eine begrenzte Zeit stabil. In der Literatur werden verschiedene Zeiträume angegeben:

a) 2 Wochen bei 5 - 8° C (NEILL u.a.1967)

b) 5 Wochen bei 4° C (MARTIN u.a.1970)

c) über Nacht bei Raumtemperaturen (REEVES u.a.1970)

d) 1 Stunde bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 6° C (JOHANSSON 1969a)

Worauf diese z.T. erheblichen Diskrepanzen zurückzuführen sind, ist nicht bekannt, aber es scheint so zu sein, daß Hundeplasma in wässriger Lösung offenbar stabiler ist. Die beiden Autoren (NEILL u.a.1967, MARTIN u.a.1970), die längere Zeiträume angegeben haben, arbeiteten mit Hundeplasma, während REEVES u.a. (1970) und JOHANSSON (1969a) Frauenplasma verwendeten.

Auf jeden Fall ist es notwendig, für jedes individuelle CBG-Plasma den Zeitraum, in dem die Bindungskapazität optimal ist, auszutesten. Das Ergebnis unserer Versuche kann man aus der Abbildung 3 ersehen. Die Stabilität wurde bei Zimmertemperatur (ca. 25° C) geprüft, da wir den gesamten Versuchsansatz in einem normalen Laboratorium ablaufen lassen - im Gegensatz zu HOPPER und TULLNER (1970), die in Anlehnung an STROTT und LIPSETT (1968) den Kompetitionsteil des Versuches im Kältelabor ausführen. Dabei zeigt sich bei allen CBG-Plasmen ein Maximum in der Bindungskapazität bei ca. 40 Minuten, was mit dem Ergebnis von JOHANSSON (1969a), der ebenfalls humanes CBG-Plasma benutzt, gut übereinstimmt.

2.3.3. Trennung von proteingebundenen von ungebundenen Steroiden

Während MURPHY (1964) in der Arbeit, die die Protein-Bindungsanalysen einführte, die Trennung der freien von den gebundenen Steroiden mit der Dialyse vornahm, führte sie 1964 die Gelfiltration mit Sephadex und 1967 die Adsorption an FULLER's Erde und LLOYD's Reagenz, dextranbeschichtete Holzkohle bzw. Florisil ein. Heute ist (s. Tabelle 1) die Sephadexsäulen- bzw. Florisiladsorptionstrennung im Gebrauch. MURPHY hatte schon 1967 darauf hingewiesen, daß Florisil gut geeignet wäre, sofern man als Indikator-Steroid Corticosteron-^{3}H benutzt.

REEVES u.a. (1970) forderten mit einem Hinweis auf MURPHY (1967) das individuelle Austesten auch des Florisils. Dabei muß es darum gehen, die geeignete Menge herauszufinden, die im Probenansatz das freiwerdende Indikator-Steroid aufzunehmen in der Lage ist.

Das gewaschene Florisil wurde in folgender Weise ausgetestet (nach MURPHY 1967):

Eine gleiche Menge Corticosteron-^{3}H, die der später im Versuch verwendeten entspricht, wurde zum einen in Aqua bidestillata und zum anderen in eine 20 %ige Plasmalösung eingebracht. Jeweils 1 ml Proben wurden dann mit steigenden Florisilmengen ausgeschüttelt. Ein aliquoter Teil des Überstandes wurde danach zur Szintillationsmessung überführt und die Ergebnisse als Prozent der Gesamtaktivität in 1 ml gegen die Menge Florisil aufgetragen (Abb. 6). Der optimale Bereich ist durch den größten Abstand zwischen beiden Kurven gekennzeichnet, d.h. nur geringe Adsorption von gebundener Aktivität und fast maximale Adsorption von freier Aktivität. In unseren gewählten Versuchsbedingungen liegt dieser zwischen 70 und 100 mg Florisil und verändert sich mit geringer Änderung der Florisilmenge nur geringfügig.

Dieser Umstand war für uns maßgebend, einem weiteren Vorschlag von MURPHY (1967) zu folgen, die Florisilmenge mit einem Löffel abzumessen, der naturgemäß eine Streuung zeigt. Dieser Löffel aus Plexiglas zeigt die Abbildung 7, er mißt 92,3 mg mit einer Standardabweichung von $\pm$ 3,8 mg (N = 10).

Abb. 6:
Abhängigkeit des Trenneffektes durch Florisil von der Menge

Anmerkung:
Die Ordinate zeigt in diesem Falle die Meßwerte der an Florisil gebundenen Fraktion (Meßpunkte bei 20,40, 80, 150 und 200 mg)

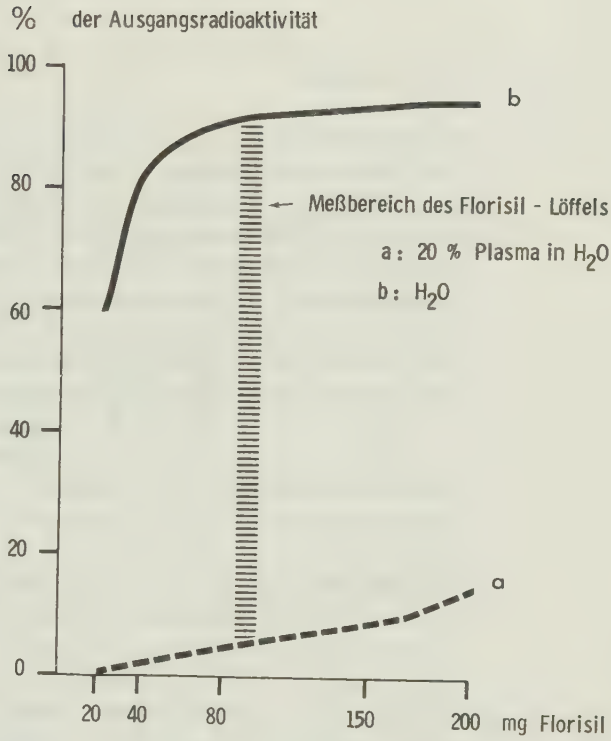
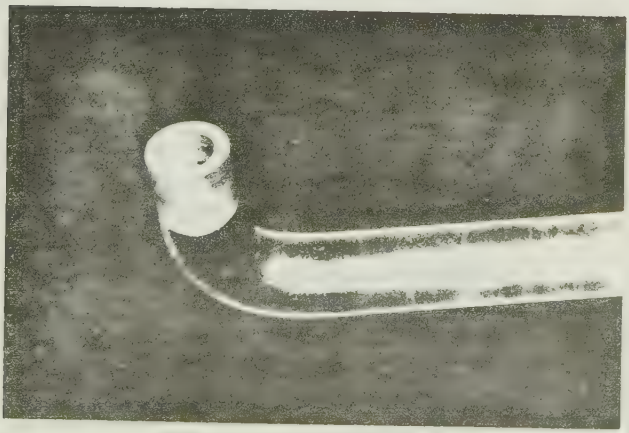


Abb. 7:
Florisil-Meßlöffel aus Plexiglas



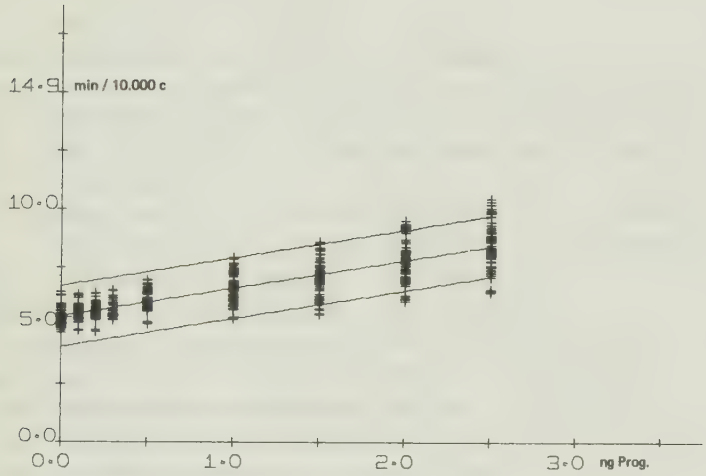
2.3.4. Standardkurve

Die Quantifizierung der unbekannten Progesteronmengen aus den Plasmaproben geschieht mit Hilfe einer in jedem Versuch mitlaufenden Standardkurve, in der die Meßwerte der Radioaktivitätsmessung gegen die bekannten Progesteronmengen aufgetragen sind. In der Literatur werden in diesen Standardkurven die absolute Radioaktivität bzw. der Prozentsatz von der Ausgangsaktivität gegen die Progesteronmengen aufgetragen. Dabei entstehen die bekannten hyperbelähnlichen Kurven (siehe auch Zeichnung 5).

Wir tragen, einem Vorschlag von MURPHY (1967) folgend, unsere Radioaktivitätswerte als Reziproke - z.B. Minuten pro 10.000 Impulse - auf, da wir dann eine lineare Funktion erhalten.
Dazu MURPHY (1967): "If the reciprocal of the per cent bound steroid is used, essentially a straight-line relationship is obtained over the usable range."

Theoretisch kann diese lineare Funktion, die allerdings nur einen Anfangsbereich betrifft, nicht untermauert werden. Allerdings haben wir insgesamt 23 Standardkurven jeweils mit Doppelbestimmungen mit Hilfe eines Computers analysiert (siehe Abbildung 7), wobei sich eine statistisch gesicherte ($\beta < 0.001$) gerade Regression mit dem Faktor 0,85 ergab.

Aus der Zeichnung ist jedoch die erhebliche Streuung der Werte erkennbar, die sich aus den Unterschieden von der einen zur anderen Standardkurve ergibt. Aus diesem Grund ist es notwendig, in jedem Ansatz Standardwerte mitlaufen zu lassen; es gibt offenbar unbekannte und daher nicht standardisierbare Einflüsse auf die Proteinbindung ("inter-assay error").



YYYY = 1·214*XXXX + 5·416
R = 0·850, P < ·001
N = 662 WERTEPAARE

Abb. 7 : Regressionsanalyse von 23 Standardkurven

(Computeranalyse durch Unterstützung der Abteilung für Ganzkörperzähler und Elektronenrechner der Strahlenklinik im Klinikum Steglitz, Prof. Dr. Koeppe)

2.3.5. Zuverlässigkeitskriterien

2.3.5.1. Spezifität

Die Spezifität der Progesteronmethode von JOHANSSON (1969a) hängt ausschließlich von dem Extraktionsschritt ab, setzt man voraus, daß die Bindungseigenschaften von CBG sich individuell nicht unterscheiden.

Die Extraktion von Progesteron aus biologischem Material geschieht zu allermeist mit Hilfe von Petroläther (s. Tab. 1). Schon MURPHY (1967) hatte dies in ihrem Methodenvorschlag vorgesehen. Das nur gering polare Progesteron hat eine ausgezeichnete Löslichkeit in dem nicht polaren Petroläther und die bei anderen Methoden (Kolorimetrie und Gaschromatographie) störende gleichzeitige Extraktion von Lipiden spielt bei der Progesteron-Bindungsmethode offenbar keine Rolle. Neben Progesteron werden allerdings noch weitere Steroide durch Petroläther extrahiert, in wesentlichen Mengen z.B.

a) 17a-Hydroxy-Progesteron:	14 - 40 %	
b) 2a-OH-pregnen-3-on:	64 - 90 %	(NEILL u.a.1967
c) Testosteron:	28,5 - 40 %	JOHANSSON 1969a,
d) 3ß-Hydroxy-5-pregnen-20-on:	78 %	REEVES u.a.1970)
e) 4-Androsten-3,7-dion:	81 %	

Da diese Steroide bis auf Androstendion ebenfalls an CBG um die Bindungsstellen konkurrieren, und zwar in der Reihenfolge a (stärker als Progesteron) - b - c - d (REEVES u.a. 1970), wurde von MURPHY (1967) die weitere Reinigung durch Dünnschicht angegeben, die fast alle Autoren bis jetzt übernommen haben. Lediglich MARTIN u.a. (1970) gaben die Reinigung mittels Papierchromatographie an und JOHANSSON (1969a) verzichtete völlig auf einen weiteren Reinigungsschritt.

JOHANSSON's Überlegungen, denen die Anwendung der Methode im normalen menschlichen Zyklus, d.h. nicht in Zuständen, in denen man mit veränderten Steroidmustern durch abnormale Produktion und/oder Methabolismus rechnen muß, zu Grunde lag, zeigten ihm, daß der Fehler unter 2 % liegt. Dies gilt bei ihm in der Corpus luteum-Phase unter seinen Extraktionsbedingungen und unter Zugrundelegung von Werten, die RUNNEBAUM u.a. (1965) für die betreffenden Steroide angegeben hat. Zusätzlich konnte er Parallelbestimmung in einem Zyklus mit und ohne Dünnschichtreinigung keine signifikanten Unterschiede feststellen (JOHANSSON 1969a). Da die Extraktionsfähigkeit des verwendeten Petroläthers die entscheidende Rolle bei der Kurzmethode spielt, ist auch daraufhin jede Petrolätherchargе zu prüfen.

Unsere Werte, die die Eigenschaften der Charge Nr. 9676152 der Firma Merck kennzeichnen, ergeben sich aus der folgenden Tabelle:

Tabelle 4

Steroid	Markierung	Wiederfindung	Vergleich (JOHANSSON 1969a)
Progesteron	^{3}H	85,9 %	85,5 %
17-OH-Progesteron	^{3}H	16,8 %	14,0 %
Testosteron	^{3}H	30,0 %	28,5 %
Cortisol	^{14}C	0,12%	0,5 %
Corticosteron	^{3}H	0,1 %	0,5 %

Dabei wurde einer Plasmaprobe von 0,2 ml eine ausreichende Menge des markierten Steroids zugesetzt und - wie im normalen Ansatz - einmal mit 2 ml Petroläther 1 Minute extrahiert.

Da diese Werte sich mit denen von JOHANSSON (1969a) angegebenen im wesentlichen decken, erfüllen wir insofern die Bedingungen für seine Kurzmethode. Dies bedeutet, daß eine

vollständige Spezifität in der Endbestimmung nicht erreicht ist; der Fehler ist bekannt, er wird bei der Interpretation der erhaltenen Werte mit berücksichtig werden müssen.

2.3.5.2. Genauigkeit

Bei 23 hintereinander bestimmten Werten zwischen 1,7 und 8,6 ng/ml ergab der Variationskoeffizient eine Genauigkeit von 15,7 % ± 21,3 (S.A.). Die hohe Standardabweichung ist zu erklären durch die Tatsache, daß fast in jedem Versuchsansatz 1 - 2 Werte, d.h. ca. 10 %, in der Doppelbestimmung erheblich auseinanderfallen. Da die Ursache dafür in der Regel nicht feststellbar ist - obwohl die Vermutung der Verunreinigung von Glasmaterialien naheliegt - und damit der Fehler nicht ursächlich beseitigt werden kann, wurde am Prinzip der Doppelbestimmung auch bei der Routinean-$ wendung festgehalten. Danach wird jeder Wert, der in beiden Ergebnissen eine höhere Variation als 10 % zeigt, wiederholt.

2.3.5.3. Empfindlichkeit

Mit Hilfe der Werte, die in die Computeranalyse (s. 2.3.4.) eingegangen sind, ist auch die untere Empfindlichkeitsgrenze des Versuchsansatzes bestimmt worden: Der Wilcoxon-Test für 2 Stichproben (Geigytabellen 1970) gab für die Werte 0 und 0,1 ein "p" zwischen 0,05 und 0,02 (0,02 p 0,05) und für die Werte 0 und 0,2 ng ein "p" kleiner als 0,01 (p 0,01). Das heißt, Werte ab 0,1 ng abwärts können nicht mehr sicher von Null unterschieden werden, bei unserer üblichen Extraktion von 0,2 ml Plasma ist die untere Meßgrenze bei 0,5 ng/ml.

In diesen Bereich fällt auch unser Leerwert, er ist nicht signifikant von Null unterschieden und hat eine Größe von 0,06 ng.

2.3.5.4. Wiederfindung

Es wurden 0,2 ml-Plasmaproben ca. 1 ng Progesteron-^{3}H zugesetzt und 5 Minuten bei 40°C inkubiert. Danach wurde in üblicher Weise (s. 2.2.) mit Petroläther ausgeschüttelt und der Überstand abgehebert und die Radioaktivität im Szintillationsmesser bestimmt.

Die Wiederfindung war 82,1 % ± 5,7 (S.A.) (n = 11). Ein Versuch, das Ausschütteln maschinell ("Vortex-Mischer" s. 2.1.) zu standardisieren, ist fehlgeschlagen. Die Wiederfindung war 52,2 % ± 8,0 (S.A.) (n = 13). Die Maschinen-Schüttelung bringt danach eine geringere Ausbeute und zudem noch eine höhere Streuung, die an der höheren Standardabweichung erkennbar ist.

3. Ergebnisse

3.1. Normalzyklen

Aus der Abbildung 8, die einen gesamten Zyklusverlauf bei einer Probandin zeigt, ist der bei unseren Ergebnissen typische Verlauf der Progesteron-Spiegel zu entnehmen: Am Tage des LH-Maximums zeigt sich schon ein gewisser Progesteron-Anstieg, der dann innerhalb von 7 Tagen zu einem Maximum führt, das über 1o Nanogramm/ml Plasma liegt, dann folgt ein kleines Plateau, das in einem raschen Abfall bis zum Einsetzen der Menstruationsblutung mündet.

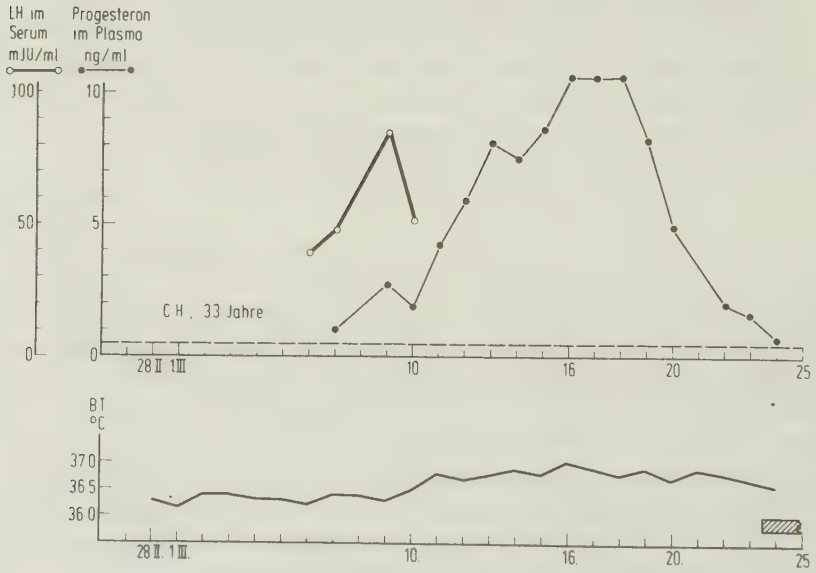


Abb. 8: Progesteron- und LH-Spiegel in einem Normalzyklus (BT = Basaltemperatur)
LH im Serum nach FRANCHIMONT (1966) durch Dr. MAGNUS (Abteilung für gynäkologische Endokrinologie, Klinikum Steglitz)

Die Zyklusdauer beträgt in diesem Fall 26 Tage mit einer Lebensspanne des Corpus luteum - gerechnet vom Tage des LH-Maximums bis zum Einsetzen der Menstruationsblutung - von 14 Tagen.

Die beiden folgenden Abbildungen (9 und 1o) zeigen die Zusammenstellung der Ergebnisse von 6 vollständig untersuchten Zyklen, die sich klinisch als normale Menstruationszyklen dargestellt haben. Kriterien dazu waren

1. eine gesamte Länge von 26 - 3o Tagen,
2. ein biphasischer Basaltemperaturkurvenverlauf,
3. in Stärke und Länge normale vorausgehende und nachfolgende Menstruationsblutung,
4. zeigte die Patientin keinerlei Hinweis auf irgendwelche endokrinen Störungen.

In der Abbildung 9 sind die Werte korreliert auf den Tag des maximalen LH-Spiegels als ein Indikator für die Ovulation.
Aus der Abbildung ist deutlich zu ersehen, daß neben einem gewissen Anstieg des Progesterons unter dem LH-Maximum die Progesteron-Werte rasch ein Plateau von über 1o Nanogramm/ml innerhalb von 6 Tagen erreichen. Der Abfall erscheint etwas protrahiert, dies ist aber sicher die Folge der unterschiedlichen Dauer der Corpus-luteum-Phase (deutlich gemacht an den Pfeilen, die in Verbindung mit der Zahl den Eintritt der Menstruation angeben).

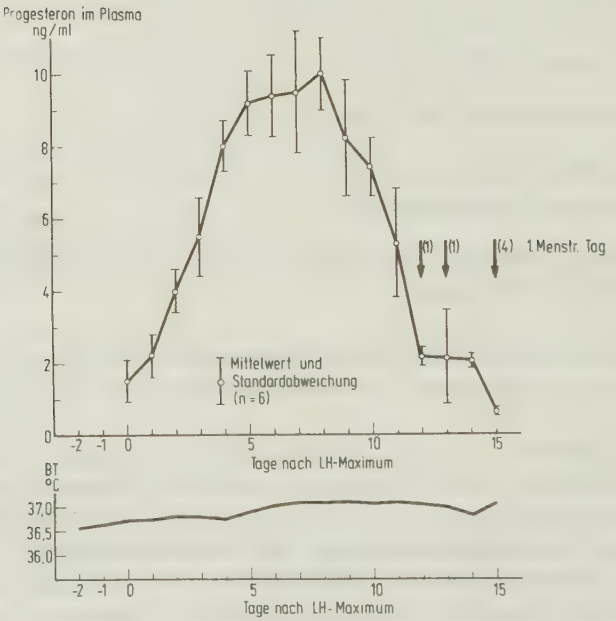


Abb. 9: Normalwerte der Progesteron-Spiegel in der Corpus-luteum-Phase bezogen auf das LH-Maximum

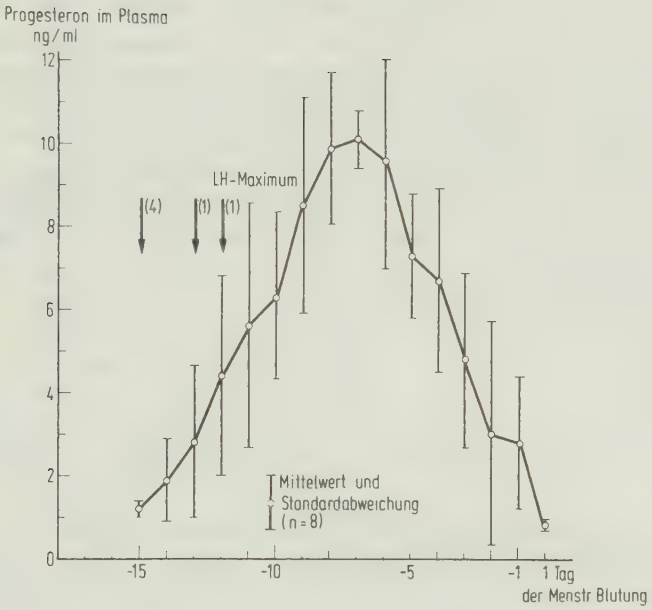


Abb. 1o: Normalwerte der Progesteron-Spiegel in der Corpus-luteum-Phase bezogen auf den 1. Tag der folgenden Menstruationsblutung

In der Abbildung 1o sind die Progesteron-Werte auf den ersten Tag der folgenden Menstruationsblutung bezogen. Prinzipiell hat sich gegenüber der Abbildung 9 nichts verändert, allerdings ist der Anstieg am Beginn der Gelbkörperphase nicht so ausgeprägt - auch hier ist dies begründet in der unterschiedlichen Länge der individuellen Zyklen.

3.2. Verlängerte Zyklen

Im Zuge unserer Untersuchung, die den Verlauf des Progesteron-Spiegels im normalen Zyklus zeigen sollte, dokumentierten wir 2 Zyklen, die zunächst verlängert waren und anhand der Basaltemperaturkurve anovulatorisch erschienen. Die Ergebnisse der Bestimmung von Serum-LH und Plasma-Progesteron sowie in einem Falle von Urin-Pregnandiolausscheidung sind aus den beiden folgenden Abbildungen (11 und 12) zu entnehmen. Beide Probandinnen hatten vor diesem Zyklus eine kontrazeptive Medikation in Form der Kombinationspille bekommen, der zweite darauf folgende Zyklus war bei beiden von normaler Länge und zeigte einen biphasischen Basaltemperaturkurvenverlauf.

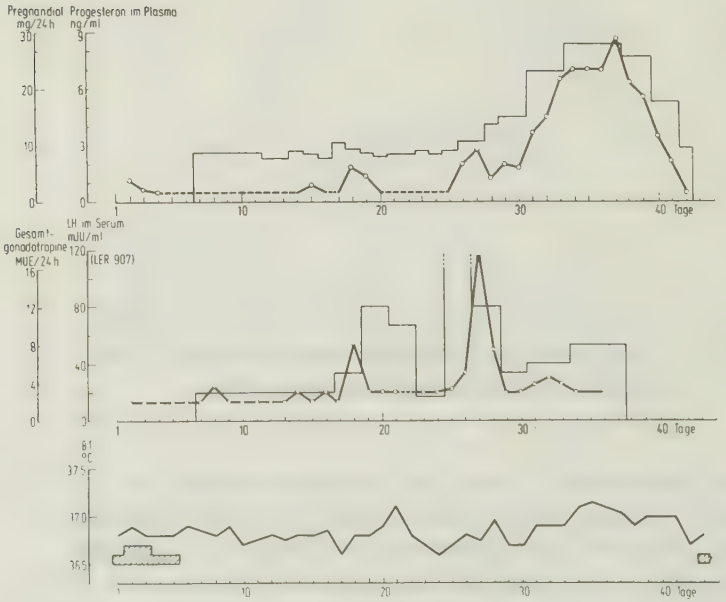


Abb. 11: Zyklus der Probandin I.S.
Pregnandiol im Harn nach HAMMERSTEIN u.a.(1968).
LH im Serum - s. Abb. 8
Gesamtgonadotropine durch Mäuse-Uterus-Test

Die Befunde bei der 24-jährigen Probandin I.S. zeigen folgenden Verlauf (Abbildung 11):

1. eine auf den ersten Blick monophasische Basaltemperaturkurve, evtl. ist am Ende eine 12-tägige Hyperthermie erkennbar.

2. Ungefähr am erwarteten Ovulationstermin (18. Zyklustag) sieht man eine LH-Spitze, die aber nicht die Höhe des normalen Maximums (ca. 9o - 12o mIU/m$_{\ell}$) erreicht. Zur gleichen Zeit läßt sich für ungefähr 3 Tage Progesteron nachweisen.

3. Am 27. Zyklustag erreicht der Serum-LH-Spiegel ein normales Zyklusmaximum, darauf folgt eine 14-tägige Gelbkörperphase, in der der Progesteron-Spiegel im Bereich unserer Normalwerte liegt.

Die Ergebnisse von der anderen Probandin G.B., 3o Jahre alt, sind aus der Abbildung 12 zu entnehmen:

1. Eine monophasische Basaltemperaturkurve,

2. am 16. Zyklustag eine diskrete 2 - 3-tägige Progesteronproduktion,

3. am 23. Zyklustag eine LH-Spitze deutlich unterhalb der normalen maximalen LH-Produktion im Zyklus. Daran anschließend eine 1o-tägige Phase, in der Progesteron im Plasma nachgewiesen werden kann, aber sowohl die Länge dieser Gelbkörperphase als auch die Höhe (einen Abfall während der Blüte des Corpus luteum ist in einem Normalzyklus von uns noch nie beobachtet worden) der Progesteron-Spiegel sind deutlich unter den normalen Werten.

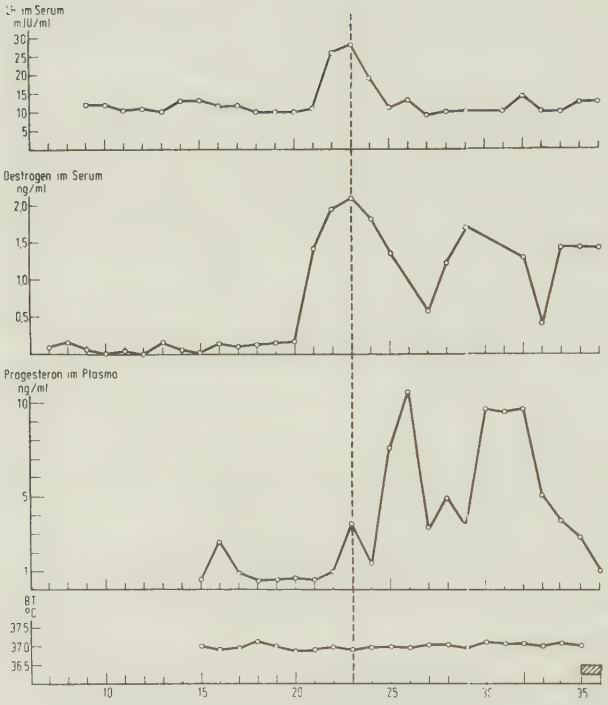


Abb. 12: Zyklus der Probandin G.B.

LH im Serum s. Abb. 8

.3. Ovulationsauslösung

Die Ergebnisse der Plasmaprogesteron-Bestimmung nach 3 erfolgreichen Versuchen, Ovulationen durch HMG und HCG auszulösen, sind aus der Abbildung 13 zu entnehmen. Sie zeigt 3 Zyklen, 2 von der Patientin J.L. mit einer 10-jährigen sekundären Amenorrhoe und 1 von der Patientin R.B., sekundäre Sterilität bei Oligomenorrhoe.
In der Zeichnung sind diese Zyklen synchronisiert auf den ersten Tag der HCG-Injektionen. Im Zyklus 2 sind zusätzlich die Ergebnisse der Gesamt-Östrogen-Bestimmung im Urin nach BROWN u.a. (1968) mittels der Säulendiagramme eingetragen.

Zyklus 1 beinhaltet eine von der Länge her normale Gelbkörperphase, in der aber die Progesteron-Werte ca. um das 3- bis 4-fache der Normalwerte ansteigen.
Zyklus 2 läßt zunächst den Anstieg der Gesamt-Östrogene zu einem Maximum erkennen, das nach der ersten HCG-Injektion liegt. Wahrscheinlich ist damit gemäß der Vorstellung von BROWN u.a. (1969) die erste HCG-Injektion zu früh gekommen, da er gefordert hat, daß sie im Maximum der Gesamt-Östrogen-Ausscheidung erfolgen muß. Unter dem Östrogen-Maximum steigt schon der Plasmaspiegel des Progesterons an, um dann im Verlauf der Gelbkörperphase, die auf 10 Tage verkürzt ist, den zweifachen Normalwert zu erreichen.
Zyklus 3 zeigt zunächst den erfolgreichen Versuch einer Ovulations- und Schwangerschaftsauslösung. Nach einem stetigen, den normalen Verhältnissen angeglichenen Anstieg des Progesterons auf Werte, die ca. das Anderthalbfache der Normalwerte ausmachen, kommt es nach einem kurzen Abfall zu einem erneuten Anstieg. Die gesamte Gelbkörperphase ist 34 Tage lang, und in Verbindung mit den Ergebnissen einer semiquantitativen immunologischen LH- bzw. HCG-Bestimmung im Urin (Luteonostikon) ist dies als eine beginnende Gravidität zu deuten. Allerdings kommt es dann trotz noch deutlich erhöhter HCG-Ausscheidung zu einem schnellen Abfall

des Progesterons und konsekutiv am 33. Tag nach der ersten HCG-Injektion zu einer starken Blutung.

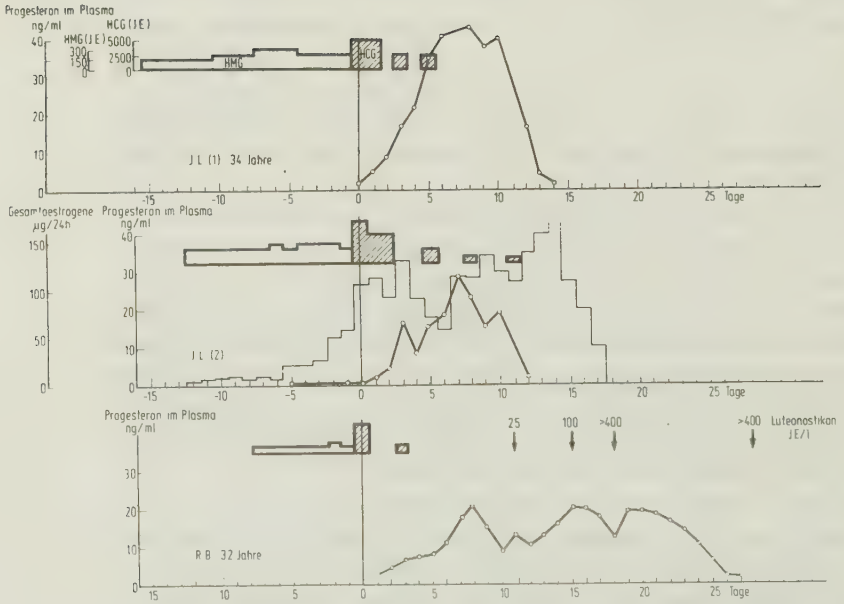


Abb. 13: Progesteron-Spiegel (und in einem Falle Gesamt-Östrogen-Ausscheidung nach der Methode von BROWN u.a. (1968) nach Ovulationsauslösung mit HMG / HCG

3.4. Gravidität

Unsere Erfahrungen beschränken sich hier auf eine kontinuierlich beobachtete Schwangerschaft, die einen völlig normalen Verlauf zeigte und mit einer komplikationslosen Geburt beendet wurde, und auf Einzelbestimmungen, in denen meistens die Frage einer Gefährdung der Schwangerschaft im Vordergrund stand. Die Ergebnisse lassen sich aus der Abb. 14 entnehmen:
Die durchgezeichnete Linie verbindet alle Werte, die bei einer Patientin gewonnen wurden, die geschlossenen Punkte sind Einzelbestimmungen bei Patientinnen, deren Schwangerschaft zur Geburt eines gesunden Kindes geführt haben, die offenen Punkte Ergebnisse bei Patientinnen, deren Schwangerschaft durch einen Spontanabort endete. Diese letzten Ergebnisse sind wegen der besseren Übersicht in Schwangerschaftsmonats-Intervallen aufgetragen.

An der Schwangerschaftsverlaufskurve lassen sich drei verschiedene Phasen erkennen:

1. Bis zur 2o. Woche ein Plateau mit Werten, die etwas über dem Mittel des Maximums in der Corpus-luteum-Phase liegen,
2. von der 2o. bis 32. Woche eine Phase des Anstiegs der Progesteronwerte,
3. ab der 32. Woche ein weniger starker Anstieg bis zur Geburt.

Darüber hinaus sind bei dieser Patientin weitere Bestimmungen in kurzfristigen Abständen nach dem Partus erfolgt, die den schnellen Abfall des Progesterons zeigen.

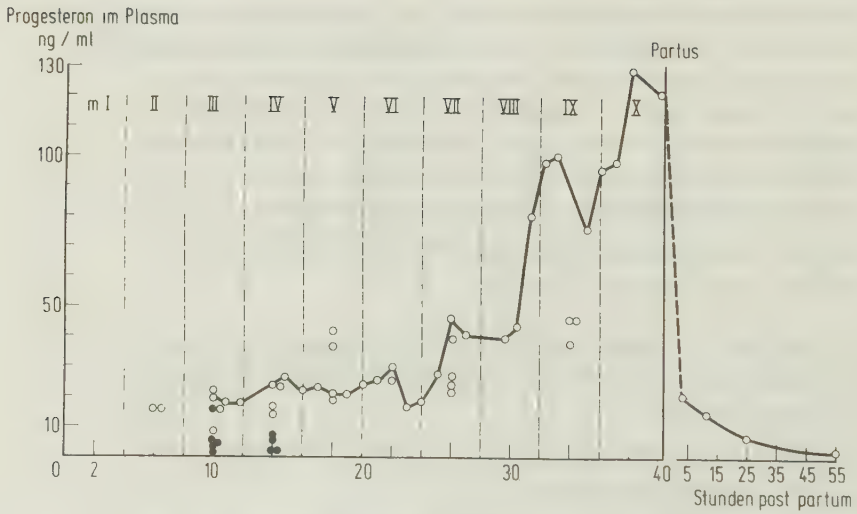


Abb. 14: Progesteron-Werte in der Schwangerschaft
(Abszisse in Schwangerschaftswochen)

o-o : kontinuierlich beobachtete Schwangerschaft
o : Einzelwerte aus Normalschwangerschaften
● : Einzelwerte aus "Abortschwangerschaften"

Diskussion

Der Progesteron-Spiegel im Blut ist eine Größe, die sich gesetzmäßig zyklisch verändert. Er ist demnach nicht ein definierter "Normalwert" mit bestimmten Parametern (wie zum Beispiel Geschlecht, Größe oder Gewicht) versehen anzugeben, sondern zu seiner Beurteilung benötigt man entweder von ihm unabhängige aber die gleiche Fragestellung berührende Daten (z.B. Zyklustag bzw. besser Ovulationstermin, Alter der Gravidität, Cervixschleimbeschaffenheit) oder man vergleicht mehrere Werte als Serienbestimmung untereinander.
So hat es sich in der wissenschaftlichen Diskussion ergeben, daß Progesteron-Werte im Blut in aller Regel als Verlaufsfunktion dargestellt werden, d.h. man betrachtet einen gesamten Zyklus oder einen Schwangerschaftsverlauf.

Dabei ergeben sich zwei Fragen:

1. Ist es statthaft, zur Gewinnung von Normalwerten - darum wird es sich im ersten Schritt immer handeln müssen - Werte von verschiedenen Individuen in einem Diagramm zusammenzufassen?
   So hat z.B. JOHANSSON(1969b)den Progesteron-Spiegel in der Schwangerschaft aus 649 Bestimmungen bei 481 verschiedenen Frauen zusammengestellt.
2. Welche konstanten Parameter sind geeignet, die Abhängigkeit des variablen Progesteron-Wertes als Funktion aufzutragen?
   Während diese Frage bei Werten aus der Schwangerschaft in der Regel leicht zu beantworten ist - hier wird die Dauer der Schwangerschaft, z.B. in Wochen angegeben, die Rolle des konstanten Parameters übernehmen - wird die Zuordnung der Zykluswerte sehr verschieden gehand-

habt. So benutzt JOHANSSON (1969a) sowohl den Beginn der Menstruationsblutung als auch den Tag der maximalen Östrogenausscheidung, NEILL u.a. (1967) z.B. verwenden das Maximum der LH-Spiegel im Serum.

Weil diese beiden Fragen von verschiedenen Autoren verschieden beantwortet werden, ergeben sich zum Teil erhebliche Schwierigkeiten, die berichteten Daten zu vergleichen.

Diese Schwierigkeiten werden dann noch erheblich größer, wenn man den praktisch klinischen Aspekt mitberücksichtigt. Dabei geht es in den meisten Fällen doch darum, ob zu einem aktuellen Zeitpunkt der Progesteron-Spiegel der "Norm" entspricht. Wenn man nicht grundsätzlich nur Werte der gleichen Patientin miteinander vergleicht, was sicher ein Optimum an Aussage zulassen würde, aber aus Gründen der Praktikabilität nur in seltenen Ausnahmefällen möglich sein wird, muß man Kriterien entwickeln, nach denen man Beurteilungen abgeben will.

In den folgenden Unterabschnitten wird es auch um die Entwicklung dieser Kriterien gehen müssen.

4. Normalzyklen

4.1. Gelbkörperphase

Die bisher in der Literatur veröffentlichten Ergebnisse, die mit der Proteinbindungsmethode erzielt worden sind, sind zum einen weitgehend untereinander sehr ähnlich und zeigen zum anderen eine gute Übereinstimmung mit den oben angegebenen Werten (3.1.).

Während der Bezugspunkt in den meisten Fällen (NEILL u.a. 1967, YOSHIMI u.a. 1968, STROTT u.a. 1969) das LH-Maximum ist,

bezieht JOHANSSON (1969a) seine Werte neben dem Beginn der folgenden Menstruationsblutung auch auf das Maximum der Gesamt-Östrogen-Ausscheidung, HAGERMANN und WILLIAMS (1969) benutzten bei dem angegebenen Zyklus den Temperatursprung in der Basaltemperaturkurve. Dabei wird die Länge der Corpus-luteum-Phase zwischen 12 und 15 Tagen und am häufigsten mit 14 Tagen angegeben.

In dem Abschnitt 3.1. sind zwei verschiedene Möglichkeiten dargestellt worden. Die Abbildung 9 zeigt als Bezugspunkt den maximalen LH-Spiegel im Serum als ein der Ovulation unmittelbar zugeordneter Parameter. YUSSMANN u.a. (1970) zeigen in einer Studie, in der sie die LH-, FSH- und Progesteron-Spiegel in 8stündigen Abständen bei Patientinnen, die sich einer Laparotomie unterziehen mußten, untersuchten, daß das LH-Maximum 24 - 16 Stunden vor der stattfindenden Ovulation liegt. Die Ovulation terminierten sie mit Hilfe einer Altersbestimmung von höchstens 48 Stunden alten Corpora lutea, die sie bei der Laparotomie gewonnen hatten.

Eine solche Darstellung ist sicher die geeignetere zur Beurteilung von Progesteron-Werten in der Corpus-luteum-Phase, weil die Entwicklung des Gelbkörpers eine Folge der stattgefundenen Ovulation ist. Andererseits wird man damit klinischen Erfordernissen nicht gerecht, da die Terminierung der Ovulation nur in Ausnahmefällen einigermaßen sicher gelingt. Daß die Basaltemperaturkurve nur einen sehr groben Anhaltspunkt dafür gibt, läßt sich aus der miteingezeichneten Kurve in Abbildung 9, die aus den Mittelwerten der individuellen Temperaturwerte erstellt ist, unschwer entnehmen. Hier ist leider kein deutlicher Sprung von einer hypo- zu einer hyperthermen Phase zu erkennen.

Für die Erfordernisse des praktizierenden gynäkologischen Endokrinologen, insbesondere in der Sterilitätsberatung,

eignet sich besser die Darstellung der Zeichnung 10, in der Progesteron-Werte auf den Tag der einsetzenden Menstruationsblutung bezogen sind. Hier ist dann im Vergleich zu den einzelnen Patientenwerten wenigstens eine retrospektive Aussage möglich.

Eine weitere untereinander vergleichbare Information ist die Höhe des Progesteron-Maximums. Hier sind stärkere Schwankungen erkennbar, sie liegen zwischen 7 und 20 Nanogramm, wobei der Wert von JOHANSSON (1969a), der einen Mittelwert aus 20 individuellen Kurven darstellt, 16 Nanogramm beträgt. Der hier berichtete Wert mit etwas über 10 Nanogramm liegt deutlich darunter, aber erfüllt ein Kriterium des Normalzyklus von JOHANSSON (1969a, 1970), der einen Anstieg über 10 Nanogramm gefordert hat. Allerdings korrigiert JOHANSSON (1969a) alle seine Werte mit dem Faktor 1.18.Hier wurde auf einen generellen Korrekturfaktor verzichtet, da im Einzelfall die genaue Wiederfindung wegen des nicht vorhandenen internen Standards nicht festzustellen ist.

Die Dauer des Progesteron-Anstiegs von der Ovulation bis zur Spitze ist eine weitere wichtige Angabe. In der Literatur wird er zwischen 6 und 9 Tagen angegeben, d.h. das Maximum fällt ungefähr in den Zeitraum, in dem ein befruchtetes Ei das Uteruscavum erreicht und die Implantation beginnt.

Die Ergebnisse, die mit anderen Methoden erzielt worden sind, werden in der Tendenz von den Ergebnissen durch die Proteinbindungsmethoden bestätigt. Allerdings fällt auf, daß das Maximum in der Regel einen höheren Wert erreicht: So berichtet WOOLEVER (1963), der eine Doppelisotopenverdünnungsmethode benutzt, Werte von 15 und 21 Nanogramm/ml in 2 Zyklen, van der MOLEN und GROEN (1965) mit Hilfe der "electron capture"-Gaschromatographie geben einen Mittelwert der Zyklustage 16 - 24 von 15,2 ng/ml an, wobei man

annehmen muß, daß der Mittelwert der individuellen Maxima höher liegt. WYMAN und SOMMERVILLE (1968) zeigen in einer Zeichnung maximale Werte zwischen 16 und 30 Nanogramm.

HAGERMANN und WILLIAMS (1969) berichteten über einen Vergleich der Proteinbindungsmethode in der Modifikation von NEILL u.a. (1967) mit der Doppelisotopenverdünnungsmethode von WOOLEVER und GOLDFIEN (1963) an Hand der Ergebnisse eines Zyklus. Sie stellen eine gute Übereinstimmung fest: "The expected increase in concentration during the secondary phase of the cycle is demonstrated by both methods. The second method agrees quite satisfactorely." Allerdings ist aus der angegebenen Regressionsfunktion Y (PDA) = 0,77 x (DID) + 0,2 auch das Phänomen der höheren Werte abzulesen.

Ob diese Unterschiede zwischen den Ergebnissen der Proteinbindungsmethode und den anderen auf die geringere Spezifität der anderen Methoden zurückzuführen sind - was als Erklärungsmöglichkeit am nächsten liegt - oder ob andere zum Teil noch unbekannte Faktoren eine Rolle spielen, kann hier nicht entschieden werden. Allerdings sollte beim Vergleich von Hormonergebnissen immer zunächst nur von vergleichbaren Methoden ausgegangen werden.

Einige Autoren, dabei insbesondere jene, die mit anderen als Proteinbindungsmethoden arbeiten, geben ihre Ergebnisse in Mittelwerten von Zyklusbereichen (Follikel- oder Corpus-luteum-Phase, 1., 2., usw. Wochen) an (so z.B. van der MOLEN und GROEN 1965, WOOLEVER 1963, MARTIN u.a.1970). Daß dieses Verfahren, Werte zusammenzufassen, sinnvoll ist, wenn diese in diesem Bereich keine physiologischen Veränderungen zeigen, wie z.B. beim Progesteron in der Follikel-Phase, liegt auf der Hand. Aber die Aussagekraft von der Summation von Werten aus der Corpus-luteum-Phase

ist sehr begrenzt. Dieses ist auch leicht aus den Angaben zu erkennen: MARTIN u.a.(1970)berichten einen Mittelwert (± Standardabweichung) der Zyklustage 14 - 1 von 8,2 ± 7,4 Nanogramm/ml. Die hohe Standardabweichung zeigt, daß die Streuung der Werte erheblich sein muß.

Aus dieser Tatsache ergeben sich praktische Konsequenzen: Wenn man die Zuordnung eines beliebigen Wertes zu einem Zyklusabschnitt vornehmen will, kann man sich dieser Methode bedienen, vorausgesetzt, man weiß etwas über die Größe der Fehler erster und zweiter Art (falsch positive bzw. falsch negative Ergebnisse). Allerdings wird man nur selten von der Progesteron-Bestimmung die Beantwortung der Frage: Follikel oder Corpus-luteum-Phase?, d.h. Ovulation ja oder nein?, erwarten. Die Darstellung der Werte als Verlaufsdiagramm bietet die bessere Möglichkeit, wenn zwei Faktoren berücksichtigt werden:

1. Es muß ein möglichst sicherer konstanter Parameter gefunden werden (z.B. Serum-LH-Spiegel, Gesamt-Östrogen-Ausscheidung),
2. müssen mindestens zwei Bestimmungen zu verschiedenen Zeitpunkten vorgenommen werden, damit die Zuordnung zu den fast spiegelbildlichen Teilabschnitten der Verlaufsfunktion gelingt.

4.1.2. Follikelphase

Die im Abschnitt 2.4. angegebene untere Empfindlichkeitsgrenze von 0,5 Nanogramm Progesteron/ml Plasma erlaubt keine Aussage über den genauen Gehalt von Progesteron in diesem Bereich. Eine Erhöhung der extrahierten Plasmamenge erscheint sinnlos, da wegen der nicht optimalen Spezifität gerade bei geringen Progesteron-Werten der Einfluß der mitextrahierten und in die Bindung an das CBG eingehenden Steroide erheblicher würde. Da die von JOHANSSON (1969a)

angegebene Methode insbesondere den praktischen Erfordernissen eines klinisch tätigen Endokrinologen entsprechen soll, konnte die genaue Klärung des "wahren Progesteron-Gehaltes" in der Follikel-Phase vernachlässigt werden.

Verlängerte Zyklen

In der ersten bedeutenderen Arbeit, in der der Plasma-Progesteron-Spiegel kontinuierlich bei verschiedenen Individuen gemessen worden ist (WOOLEVER 1963 mit Hilfe der Doppelisotopenverdünnungsmethode), vermutete der Autor einen bemerkbaren Progesteron-Anstieg vorder Ovulation. Indem er sich auf ZANDER u.a. (1958) bezog, glaubte er, damit zum einen kleine Maxima vor der eigentlichen Gelbkörperphase und zum anderen eine Progesteronspitze von 2 - 3 Tagen ohne folgende normale Corpus-luteum-Phase erklären zu können. Sicher erlaubten die Ergebnisse wegen der methodischen Schwierigkeiten keine endgültigen Schlüsse, aber dieser Befund ist im folgenden weiter bestätigt worden. Sowohl JOHANSSON und WIDE (1969) als auch YUSSMANN und TAYMOR (1970) haben in der letzten Zeit mit verbesserten Methoden und durch Untersuchungen in kürzeren Abständen (8 Stunden) den praeovulatorischen Anstieg von Progesteron nachweisen können: "These reports, plus a demonstration in this study of a preovulatory rise of progesterone blood levels suggest an important preovulatory function for progesterone secreted by the unruptured follicles or by atretic follicles, and that function may to initiate the ovulatory process itself."

ODELL und SWERTLOFF (1968) vermuteten einen releasing-Effekt von Progesteron auf LH.
Daß die Spitze im LH-Serumspiegel der auslösende Faktor für die Ovulation, d.h. für den Follikelsprung und die Luteinisierung der Granulosazellen ist, erscheint als eine anerkannte Hypothese (YUSSMANN u.a. 1970, STROTT u.a. 1969).

Aus den beiden hier dokumentierten Zyklen (s. Abb. 11 und 12) ergibt sich das Phänomen, daß nicht in jedem Falle auf ein LH-Maximum eine normale Gelbkörperphase - definiert nach der Länge und der Intensität der Progesteron-Produktion - folgt. Auch in der Literatur sind derartige Zyklen mehrfach beschrieben worden (WOOLEVER 1963, YOSHIMI u.a. 1968, STROTT u.a. 1969, STROTT u.a. 1970). In all diesen Fällen läßt sich die Vermutung aussprechen, daß die vorangegangene LH-Spitze unternormale Werte zeigte.
Da offenbar für die Aufrechterhaltung des Corpus-luteum für eine Dauer von 2 Wochen das Vorhandensein von LH nicht notwendig ist, läßt sich aus den bisher bekannten Tatsachen folgende Hypothese formulieren:
Die Lebensdauer und die Aktivität eines Corpus-luteum ist von der Stärke eines Initialstimulus des Luteinisierungshormons abhängig.

STROTT u.a. (1970) haben die Situation auch untersucht und glauben, daß für die Ausbildung eines Corpus-luteum das FSH/LH-Verhältnis die entscheidende Rolle spielt. Hier ist wegen der fehlenden FSH-Bestimmung dieser Befund nicht zu bestätigen, aber auch die o.a. Autoren vermuten einen niedrigen LH-Spiegel zur Zeit des Maximums, den sie aber nicht statistisch sichern konnten.
Aus dem bisher Gesagten lassen sich die beiden Zyklen folgendermaßen interpretieren:
Der Zyklus der Probandin I.S. zeigt beim erwarteten Ovulationstermin einen geringen Progesteron-Anstieg, der nur ungenügend eine LH-Ausschüttung der Hypophyse hervorruft. Dieses LH-Maximum ist nicht in der Lage, die Ovulation zu initiieren, die Progesteron-Produktion versagt. In einem späteren Zeitpunkt kommt es wieder zu einem Progesteron-Anstieg, gefolgt von einer normalen LH-Spitze, und daraufhin ist eine normale Gelbkörperphase erkennbar.
Der Zyklus der Probandin G.B. zeigt ebenfalls beim ungefähren Ovulationstermin einen erhöhten Progesteron-Spiegel,

der aber keine LH-Ausschüttung zur Folge hat; eine später auftretende nochmalige Steigerung des Progesteron-Plasma-Spiegels führt zu einer LH-Ausschüttung, die niedriger als normal ist. Das initiiert offenbar eine Ovulation, die aber nur der Beginn einer verkürzten Gelbkörperphase ist. In beiden Fällen ist die Basaltemperaturkurve nicht kongruent mit den Progesteron-Befunden, somit läßt sich hier STROTT u.a.(1970)nicht bestätigen: "The increase in temperature appeares to be quite sensitive to small increase in progesterone levels."
STROTT u.a.(1969)nennen dieses Phänomen der verkürzten Gelbkörperphase "syndrom of inadequate lutenisation" und vermuten in ihm eine Ursache für Sterilität bzw. Infertilität. Weitere systematische Untersuchungen werden sicher zur weitgehenden Aufklärung dieses Sachverhaltes notwendig sein.

3. Ovulationsauslösung

Die Kontrolle der Ovulationsauslösungen ist - wie gezeigt worden ist - ein weiteres Anwendungsgebiet der Plasma-Progesteron-Bestimmung. Zunächst wird es um die Beantwortung der Frage gehen, ob eine ovulationsauslösende Maßnahme erfolgreich gewesen ist. Dies betrifft insbesondere Ovulationsauslösungen mit steroidähnlichen Substanzen, wie z.B. Clomiphen oder Epimestrol. Bei diesen Patientinnen wird meist ungefähr 1o Tage nach Beendigung der Medikationen oder, wenn die Basaltemperaturkurve einen deutlich biphasischen Verlauf zeigt, in der Mitte der Corpus-luteum-Phase der Progesteron-Gehalt im Blut gemessen.

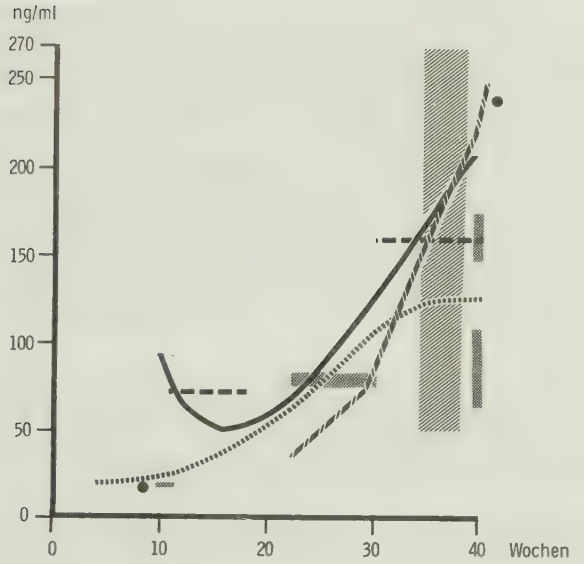
In den Fällen, in denen es trotz mehrfacher geglückter Ovulationsauslösung und beim Ausschluß von organischen Konzeptionshindernissen zu keiner Gravidität gekommen ist, ist es sinnvoll, die Qualität einer Corpus-luteum-Phase mit Hilfe kontinuierlicher Progesteron-Bestimmungen zu beurteilen.

Die gleiche Notwendigkeit ergibt sich bei dem Versuch, Ovulationen mit Hilfe menschlicher Gonadotropine auszulösen. Dabei steht die Frage im Vordergrund, wie die Medikation beschaffen sein muß, um ein bestmögliches Ergebnis zu erzielen. In diesem Zusammenhang sei nur kurz an das Problem der Auslösung von Mehrfach-Ovulationen und damit die Möglichkeit von Mehrlingsschwangerschaften erinnert.

Die Ergebnisse zeigen drei verschiedene Möglichkeiten, die bei Ovulationsauslösungen mit Gonadotropinen zu erzielen sind:
Im Zyklus 1, eine von der Länge her normale Gelbkörperphase, mit Progesteron-Werten, die aber erheblich über den Normalwerten liegen. Dies ist wahrscheinlich Ausdruck einer Aktivität von mehreren Corpora lutea, die infolge von Mehrfach-Ovulationen entstanden sind.
Im Zyklus 2 ist die Gelbkörperphase eindeutig verkürzt, während die individuellen Werte nur wenig oberhalb der Norm liegen.
Der Zyklus 3 zeigt zunächst eine, den normalen Verhältnissen sehr gut angepaßte Corpus-luteum-Phase, die dann abgelöst wird von einer Situation, die man bei der Frühgravidität findet. In Übereinstimmung mit JOHANSSON und GEMZELL (1969) scheint es offenbar wichtig zu sein, auch bei den Ovulationsauslösungen möglichst physiologische Verhältnisse zu schaffen, um die Möglichkeit zur Ausbildung einer Gravidität zu geben.

4.4. Gravidität

Die Abbildung 15 zeigt, daß die in den letzten 12 Jahren stattgefundene Verbesserung der einzelnen Methoden auf die Ergebnisse bezüglich der Progesteron-Spiegel in der Schwangerschaft keinen Einfluß gehabt hat. Man sieht deutlich einen mehr oder weniger kontinuierlichen Anstieg, ausgehend von den höchsten Gelbkörperphasenwerten bis zu maximalen Werten bei ca. 25o Nanogramm/ml. Dieses gilt mit der



Jahr	Autor	Methode
1958	Short	U V Abs.
1962	Greig	U V Abs.
1963	Somerville	U V Abs. Thiosemi-Carbazon-Deriv.
1966	Lurie	G L C
1967	Wiest	D I D
1968	Yanone	G L C
1969	Johansson	Protein-Bindung ohne D S

Abb. 16: In der Literatur angegebene Progesteron-Werte in der Schwangerschaft

Abkürzungen: GLC = Gaschromatographische Endbestimmung
DID = Doppelisotopenverdünnungs-methode
DS = Dünnschichtchromatographie

Einschränkung van der MOLEN und AAKVAAG(1967): "There is a large scattering, however, of the plasma progesterone levels in different subjects at the same period of gestation", und anderer Stelle: "Relatively large variation (e.g. decreases of the order of 5 to 10 ng/100 ml) have, however, been observed and cannot solely be accounted for by the variability of the estimation."
Allerdings liegen die Werte, die JOHANSSON (1969) berichtet hat, deutlich unter den vorher angegebenen. Hier ist sicher auch wieder auf die unterschiedliche Methode hinzuweisen, denn JOHANSSONs Ergebnisse stützen sich auf 649 Einzelbestimmungen, so daß ein statistischer Fehler ausgeschlossen erscheint.

Die hier berichteten Ergebnisse sind damit in guter Übereinstimmung, insbesondere auch was die drei verschiedenen Abschnitte der Verlaufsfunktion betrifft (s. 3.4.). Die Progesteron-Werte nach der Geburt sind wahrscheinlich auf die Speicherung des Hormons im Fettgewebe zurückzuführen (KAUFMANN und ZANDER 1956), da offenbar die Halbwertzeit von zirkulierenden Progesteron nur 5 Minuten beträgt, was aus In-vivo-Versuchen mit radioaktiv markiertem Progesteron ersehen werden kann (THIJSSEN und ZANDER 1966).

Die Progesteron-Werte im 1. - 2. Trimenon, aus Schwangerschaften, die mit einem Spontanabort endeten, lassen die Vermutung aufkommen, daß die Möglichkeit besteht, die Prognose einer Schwangerschaft auch an Hand der Progesteron-Werte zu erkennen. Die bisher verfügbaren Daten sind zu gering, um eine statistisch gesicherte Aussage machen zu können. Aber da bis auf eine Ausnahme die beiden Gruppen (Schwangerschaft mit Partus bzw. mit Abort) voneinander getrennt sind und zudem die Einzelwerte aus Normalschwangerschaften eine Beziehung zur durchgezogenen Linie, die die Normalwerte in der Schwangerschaft repräsentieren soll, zeigen, erscheint die Hoffnung gerechtfertigt, daß der Progesteron-Bestimmung auch in der Schwangerschaft eine klinische Bedeutung zukommt.

5. Abschließende Beurteilung der Methode und ihrer klinischen Anwendbarkeit.

In den vorangehenden Abschnitten wurden zunächst einige Besonderheiten der Progesteron-Bestimmung im Plasma mit Hilfe des Proteinbindungsprinzips erwähnt. Während die Gefahrenmomente der Methoden, die mit schon länger eingeführten Prinzipien arbeiten, wie z.B. Photometrie, Fluorometrie, allgemein bekannt sind, wird sich bei den Proteinbindungsmethoden erst im Laufe der zunehmenden praktischen Anwendung herausstellen müssen, ob die Begeisterung über die erweiterten Möglichkeiten der Hormonanalytik anhält.

Zweifellos ist die deutliche Empfindlichkeitssteigerung, die diese Methoden mit sich gebracht haben und die theoretisch noch keine Grenze erreicht hat, eine sehr wichtige Tatsache. Allerdings ist ein wunder Punkt die Spezifität (s. 2.5.1.).
HEYNS und DE MOOR (1970) konnten in einem mathematischen Modell nachweisen, daß andere Substanzen, die in die Endbestimmung miteingehen, die Standardkurve nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ ändern. Dies gilt nicht nur für andere Steroide, sondern auch weitere Substanzen. REEVES u.a. (1970) berichten von Einflüssen durch das Dünnschichteluat. Es erscheint, daß bei allen bisher bekannten Methoden - hier ist auch die Reinigung mittels Papierchromatographie (MARTIN u. a. 1970) einzuschließen - ein endgültiger Erfolg, die Spezifität betreffend, noch nicht erreicht ist, obwohl dies bei diesen Methoden im Prinzip aus theoretischen Überlegungen wichtiger wäre als bei allen bisher bekannten.

Der Einfluß von Substanzen, die Nicht-Steroide sind, ist ein weiterer Punkt, an dem durch die praktische Anwendung (s. 2.3.1. und REEVES u.a. 1970)die theoretische Vorstellung (MURPHY 1967) überholt wurde. Durch die genaue Kenntnis der Natur der Protein-Steroid-Bindung einerseits und andererseits durch die ständige kritische Überprüfung der Methoden wird

auch dieses Problem gelöst werden können.
Dabei muß drei Punkten besondere Aufmerksamkeit geschenkt werden:

a) Die Austestung und Überprüfung des jeweils benutzten Stammplasmas (CBG-Plasma):
Die Übereinstimmung von gewünschtem zu optimalem Meßbereich, der durch die Veränderung der Verdünnung erreicht wird, wird das Ziel sein. Die dabei konkurrierenden Faktoren sind die Empfindlichkeit, die Genauigkeit und die Spezifität in den jeweiligen Versuchsbedingungen. Als weiteres ist die Beladung des CBG mit einem tracer-Steroid, das eine möglichst hohe spezifische Aktivität besitzt, zu erwähnen.

b) Die Extraktion:
Dies betrifft insbesondere die Methoden, die ohne weitere Reinigungsschritte auskommen. Ein Extraktionsmittel ist dann verwendbar, wenn der theoretische Fehler kleiner ist als die sonstigen Fehler im Versuchsansatz. Der theoretische Fehler ist berechenbar (JOHANSSON 1969a) auf die Normalwerte der mitextrahierten Steroide; dies bedeutet, daß bei Vorliegen von sonstigen Veränderungen im endokrinen System eine Überprüfung der Ergebnisse mit zusätzlichen Reinigungsschritten notwendig wird. Glücklicherweise sind Veränderungen im Steroidmuster bei den Fragestellungen für eine Plasma-Progesteron-Bestimmung selten.

c) Die Trennung der proteingebundenen von der ungebundenen Fraktion:
Neben der Sephadex-Säulentrennung ist aus den Vorschlägen von MURPHY (1967) die Adsorption der freien Steroide an Florisil gebräuchlich. Wichtig ist, daß nach theoretischen Überlegungen und praktischen Versuchen (s. 2.3.4.) ein Fehler wegen des Eingriffs in ein Fließgleichgewicht nicht zu vermeiden ist. Dieser Fehler sollte unter 1o% liegen und ist bis auf geringfügige Schwankungen bei

allen Proben gleich, vorausgesetzt, die gleichlaufende Behandlung wird streng eingehalten. Er kann durch im gleichen Ansatz mitlaufende Standardwerte weiter verringert werden.

Der klinischen Bedeutung dieser Progesteron-Bestimmungsmethode war ein weiterer Abschnitt gewidmet.
Die Möglichkeit zur Beurteilung der jeweiligen Zyklussituation einer Patientin erscheint insbesondere in Kombination mit anderen Methoden, wie z.B. Serum-LH-Bestimmung, Plasma-Östrogen-Bestimmung, Gesamt-Östrogen-Ausscheidung, erheblich erweitert und damit die Erkennung von Störungen und ihren pathogenetischen Prinzipien (s. 3.2. und 4.2.) und ihrer therapeutischen Beeinflußbarkeit (s. 3.3. und 4.3.).

Wichtig ist die Erkenntnis der Grenzen der Interpretationsmöglichkeiten von Ergebnissen (s. 4.1.), die es verhindern, daß die Enttäuschung im Einzelfall der gesamten Methode angelastet wird.
Für die Schwangerschaft bedeutet die Progesteron-Bestimmung eine zusätzliche Möglichkeit, die wichtige Frage der Prognose zu klären (s. 4.4.).

Bis zur Einführung der Proteinbindungsmethode zur Plasma-Progesteron-Bestimmung wurde wegen des großen Aufwandes anderer Progesteron-Methoden (s. 1.2.3.1.) versucht, die Klärung der angesprochenen Fragen durch die Bestimmung des Urin-Pregnandiols zu erreichen. Da dieses Prinzip wegen seiner langen Geschichte (s. 1.2.1.1.) als gesicherte Standardmethode anzusehen ist, ist es notwendig, einen Vergleich anzustellen:

Aus der Abbildung 16, die die Werte von Plasma-Progesteron- und Urin-Pregnandiol-Bestimmung vom gleichen Tage bei der gleichen Patientin außerhalb der Gravidität in Beziehung setzt, ist zunächst eine deutliche Abhängigkeit beider Größen zu entnehmen. Die eingezeichnete Gerade ist die aus

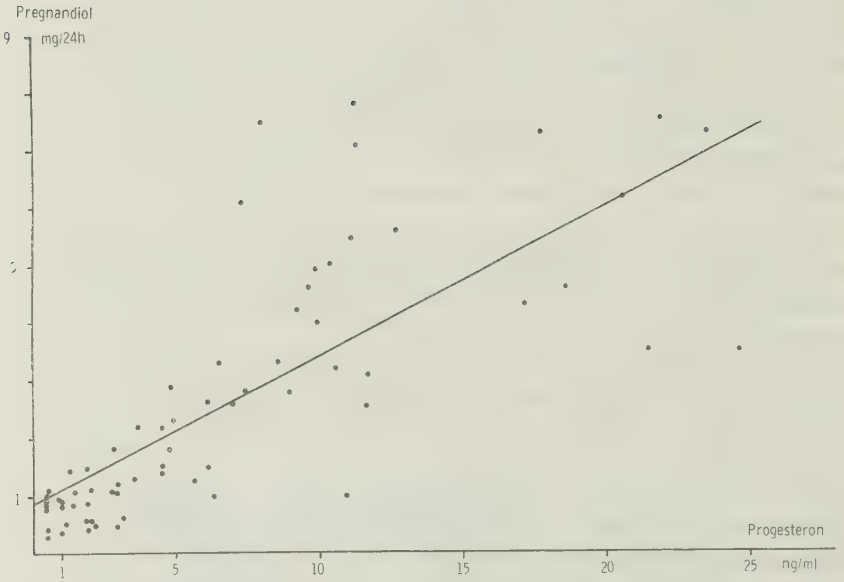


Abb. 16: Vergleich von Urin-Pregnandiol- und Plasma-Progesteron-Bestimmung
Pregnandiol-Methode s. Abb. 11

70 Wertepaaren errechnete Regressionsfunktion, sie ist mit der Formel y = 0,26 x + 0,83 zu beschreiben. Auffällig sind die beiden Teilbereiche, in denen das Gewicht der Korrelation unterschiedlich erscheint: Bis zu einem Pregnandiol-Wert von 3,5 mg/24 h entsprechend ca. 10 ng/ml Progesteron im Plasma ist eine gute Koinzidenz vorhanden, während darüberhinaus eine erhebliche Streuung sichtbar wird. Welche Faktoren dafür die Ursache sind, läßt sich bei rein phänomenologischer Betrachtungsweise nicht entscheiden; allerdings sei darauf hingewiesen, daß die hohen Werte fast ausnahmslos aus Zyklen mit einer durch HMG/HCG ausgelösten Ovulation stammen.

Auf jeden Fall kann man vermuten, daß das unterschiedliche Prinzip der beiden Methoden eine erhebliche Rolle spielt:

a) Pregnandiol ist ein Stoffwechselprodukt überwiegend des Progesteron , aber auch von Steroiden der Nebennierenrinde (z.B. Desoxycorticosteron). Neben der Produktionsrate spielt hier auch die Metabolisierungsrate eine Rolle. Es werden wahrscheinlich vom produzierten Progesteron nur bis höchstens 20 % katabolisiert (TROLLE 1955: Er hat bei In-vivo-Versuchen von injiziertem radioaktiven Progesteron 10 - 17 % als Pregnandiol wiedergefunden).

b) Urinbestimmungen sind Summationsbestimmungen über einen bestimmten Zeitraum - zumeist 24 Stunden -, während Blutbestimmungen den aktuellen Spiegel des Hormons zu jedem beliebigen Zeitraum zeigen. Dies spielt bei sich kurzfristig ändernden Hormonspiegeln eine Rolle, wie z.B. bei Tagesschwankungen. Da RUNNEBAUM (1970) zeigen konnte, daß zumindest im Zyklus und in der ersten Hälfte der Schwangerschaft keine derartige Rhythmik bei Progesteron vorhanden ist, sind daraus keine wesentlichen Unterschiede der Ergebnisse zu erwarten. Allerdings sind solche Schwankungen in der zweiten Hälfte der Schwangerschaft nachgewiesen worden (CRAFT u.a. 1969), daraus lassen sich eventuell die wechselnden Werte in der späten Gravidität (s. 3.4.) erklären, die die

Progesteron- gegenüber den Pregnandiol-Werten auszeichnen. Dies gilt insbesondere, weil CRAFT u.a. (1969) nachweisen konnten, daß es sich sicher nicht um einen 24-Stundenrhythmus handelt.

c) In eine Unrinbestimmung geht auch die Ausscheidungsrate, gegeben durch den Funktionszustand der Nieren, mit ein.

Die aufgeführten Unterschiede werden wahrscheinlich dazu führen, daß auch für klinische Zwecke beide methodischen Prinzipien - je mit ihrer speziellen Indikation - in einem guten endokrinologischen Laboratorium beibehalten werden. Dabei wird der Progesteron-Bestimmung eine dominante Rolle zufallen. Insbesondere die Praktikabilität - in einer Woche kann eine eingearbeitete Assistentin ca. 100 Progesteron-Werte als Doppelbestimmung erhalten gegenüber 20 Pregnandiol-Werten - wird den ausschlaggebenden Faktor darstellen.

Nach alledem läßt sich sagen, daß die Einführung der Bestimmungsmethode für Plasma-Progesteron nach dem Proteinbindungsprinzip in der Hand des klinisch tätigen Endokrinologen insbesondere für die Fragen der weiblichen Sterilität und Infertilität eine beachtliche Erweiterung der diagnostischen Möglichkeiten beinhaltet.

6. Zusammenfassung

1. Es wird ein Überblick gegeben über die Entwicklung der Labormethoden zur Kontrolle der Corpus luteum-Funktion. Dabei wird herausgestellt, daß erst mit der Entwicklung der Proteinbindungsmethoden eine praktikable Möglichkeit zur Messung des direkten Parameters - dem Progesteron - gegeben ist.

Die vorliegende Arbeit beschäftigt sich mit der Einrichtung, Modifikation und klinischen Anwendung einer von JOHANSSON im Jahre 1969 (a) veröffentlichten Modifikation.

2. Die kritische Überprüfung der Methoden jeweils für die gegebenen Bedingungen ist eine wesentliche Voraussetzung für die Brauchbarkeit. Die einzelnen Punkte werden angegeben und die Modifikationen in ihren Bedingungen und als Ergebnis dargestellt. Hinsichtlich der Zuverlässigkeitskriterien erfüllt die Methode die Erwartung einer klinischen Routinemethode.

3. Es werden Ergebnisse berichtet über den Progesteronspiegel im Verlaufe der Gelbkörperphase des Zyklus, bei verlängerten Zyklen, nach Ovulationsauslösung mit menschlichen Gonadotropien und in der Schwangerschaft.

4. Die hier berichteten Normalwerte stimmen gut mit Ergebnissen anderer Autoren, die vergleichbare Methoden verwenden, überein. Autoren, die mit anderen Methoden arbeiteten, haben in der Regel höhere Ergebnisse berichtet.

Die Ergebnisse bei verlängerten Zyklen werden mit Hilfe von zusätzlichen Untersuchungen von anderen Steroid- und Proteohormonen und in Ergebnissen in der Literatur in ihrem pathophysiologischen Zusammenhang diskutiert. Dabei wird die Hypothese formuliert, daß die Gelbkörperphase, d.h. die Ausbildung des Corpus luteum, abhängig ist von der Qualität der ovulatorischen LH-Spitze.

Die Ergebnisse aus Untersuchungen in der Schwangerschaft legen die Vermutung nahe, daß der Progesteronbestimmung im 1. Trimenon eine prognostische Bedeutung zukommt.

5. In einem letzten Abschnitt wird die Methode und die mit ihr gewonnenen Ergebnisse kritisch betrachtet und sie mit der bisher üblichen klinischen Routinemethode - der Bestimmung von Pregnandiol im Harn - verglichen.

Literatur

ASTWOOD, E.B.
JONES, G.E.S.
A simple method for the quantitative determination of pregnanediol in human urine
J.biol.Chem. 137,397 (1941)

BROWN, J.B.
EVANS, J.H.
ADAY, F.D.
TAFT, H.P.
TOWNSEND, L.
Factors involved in the induction of fertile ovulation with human gonadotrophins
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth. 76,289 (1969)

BROWN, J.B.
MACLEOD, S.C.
MACNAUGHTAN, C.
SMITH, M.A.
SMYTH, B.
A rapid method for estimating oestrogens in urine using a semi-automatic extractor
J.Endocr. 42,5 (1968)

BUTENANDT, A.
SCHMIDT, J.
Über die polymorphen Modifikationen des Corpus-luteum-Hormons
Ber.dt.Chem.Ges. 67,2088 (1934)

BUTENANDT, A.
WESTPHAL, U.
COBLER, H.
Über einen Abbau des Stigmasterins zu corpus-luteum-wirksamen Stoffen; ein Beitrag zur Konstitution des Corpus-luteum-Hormons
Ber.dt.Chem.Ges. 67,1611 (1934)

van de CALSEYDE, J.F.
SCHOLTIS, R.J.H.
SCHMIDT, N.A.
KUYPERS, A.M.J.
Assay of pregnanediol and pregnanetriol in low titre urines by gaschromatography
Clin.chim.Acta 27,139 (1970)

COLLINS, W.P.
SOMMERVILLE, I.F.
Quantitative determination of progesterone in human plasma by thin-layer and gas-liquid radiochromatography
Nature(London) 203,836 (1964)

CRAFT, J.
WYMAN, H.
SOMMERVILLE, I.F.
Serial analysis of plasma progesterone and pregnanediol in human pregnancy
J.Obstet.Gynaec.Brit.Cwlth. 76,1080(1969)

DORFMAN, R.J.
UNGAR, F.
Metabolism of steroid hormones
Academic Press, new York, 1965

EBERLEIN, W.R.
BONGIOVANNI, A.M.
A paper chromatographic method for the measurement of pregnanediol in urine
J.clin.Endocr. 18,300 (1958)

EDGAR,D.G. The chemical assay of progesterone
Biochem.J. 54,50 (1953)

EHRLICH,E.N. A method for measurement urinary pregnanediol by a double isotope derivative dilution technique utilizing thin layer chromatography
J.Lab.Clin.Med. 65,869 (1965)

FUTTERWEIT,W.
MACNIVEN,N.L.
DORFMAN,R.I. Gas-chromatographic identification of progesterone in human pregnancy plasma
Biochim.biophys.Acta 71,474 (1963)

FRANCHIMONT,P. Dosage radio-immunologique des hormones lutéinisantes chorionique et hypophysair
Ann.d'Endocr. 27,273 (1966)

GOEBELSMANN,U.
MIDGLEY jun.,A.R.
JAFFE,R.B. Regulation of human gonadotropins: VII. Daily individual urinary estrogens, pregnanediol and serum luteinizing and follicle stimulating hormones during the menstrual cycle
J.clin.Endocr. 29,1222 (1969)

HAGERMAN,D.D.
WILLIAMS,K.L. Comparision of a protein binding displacement method with a double isotope derivative method for determination of plasma progesterone
Amer.J.Obstet.Gynec. 104,114 (1969)

HAMMERSTEIN,J.
ZIELSKE,F. Zur Methodologie der Pregnandiolbestimmung im Harn
Z.analyt.Chem. 243,272 (1968)

HEYNS,W.
DE MOOR,P. Use of specific plasma proteins for the determination of seroids
in:Research on Steroids, Pergamon Press Oxford 1970

HOPPER,B.
TULLNER,W.W. Urinary estrone and plasma progesterone levels during the menstrual cycle of the rhesus monkey
Endocrinology 86,1225 (1970)

ISMAIL,A.A.A.
HARKNESS,R.A. The isolation of progesterone from human pregnancy urine
Biochem.J. 98,15p (1966)

ISMAIL,A.A.A.
HARKNESS,R.A.
The isolation of progesterone from human pregnancy urine
Acta endocr. 56,272 (1967)

JOHANSSON,E.D.B.
Progesterone levels in peripheral plasma during the luteal phase of the normal human menstrual cycle measured by a rapid competetive protein binding technique
Acta endocr. 61,592 (1969a)

JOHANSSON,E.D.B.
Plasma levels of progesterone in pregnancy measured by a rapid competetive protein binding technique
Acta endocr. 61,607 (1969b)

JOHANSSON,E.D.B.
Persönliche Mitteilung 1970

JOHANSSON,E.D.B.
GEMZELL,C.
The relation between plasma progesterone and total urinary oestrogens following induction of ovulation in women
Acta endocr. 62,89 (1969)

JOHANSSON,E.D.B.
NEILL,J.D.
KNOBIL,E.
Periovulatory progesterone concentration in the peripheral plasma of the rhesus monkey with a methodologic note on the detection of ovulation
Endocrinology 82,143 (1968)

JOHANSSON,E.D.B.
WIDE,L.
Periovulatory levels of plasma progesterone and luteinizing hormon in women
Acta endocr. 62,82 (1969)

JONES,G.E.S.
TURNER,D.
SARLOS,I.J.
BARNES,H.C.
COHEN,R.
The determination of urinary pregnanediol by gas liquid chromatography
Fertil.Steril. 13,544 (1962)

KAUFMANN,C.
ZANDER,J,
Progesteron im menschlichen Blut und Gewebe. II. Mitteeilung: Progesteron in Fettwebe.
Klin.Wschr. 34,7 (1956)

KELLER,M.
Eine dünnschichtchromatographische Routinemethode zur Bestimmung von Pregnandiol und Pregnantriol in Urinextrakten
Gynaecologia 160,233 (1965)

KIRTON,K.T.
NISWENDER,G.G.
MIDGLEY,A.R.J.
JAFFE,R.B.
FORBES,A.D.
Serum luteinizing hormone and progesterone concentration during the menstrual cycle of rhesus monkey
J.clin.Endocr. 30,105 (1970)

KLOPPER,A.
MICHIE,E.A.
BROWN,J.B.
A method for the determination of urine pregnanadiol
J.endocr. 12,209 (1955)

KRAIEN,Z.
LUNENFELD,B.
SKALKA,J.
A method for the estimation of individual urinary corticosteroids, pregnanediol, pregnanetriol and pregnanetriolone following separation by thin layer chromatography
Acta endocr. 61,1 (1969)

KUMAR,D.
GOODNO,J.A.
BARNES,A.C.
Isolation of progesterone from human pregnant myometrium
Nature 195,1204 (1962)

LANGENBACH,R.J.
KNOCHE,H,W.
Oxidation of progesterone and its role in the fluorimetric determination of progesterone
Steroids 11,123 (1968)

LIPP,G.
Eine neue Methode zur quantitativen Bestimmung von Pregnandiol im Urin
Acta endocr. 33,501 (1960)

LUCIS,O.J.
CUMMINGS,G.T.
TSAY,Y.H.
MINIHAN,B.
Observations on assays of urinary pregnanediol, pegnanetriol and pregnanetriolone by gas-liquid chromatography
Clin.Biochem. 2,59 (1968)

LURIE,A.O.
VILLEE,C.A.
REICH,D.E.
Progesterone in the blood. Aquantitative method employing gas liquid chromatography
J.clin.Endocr. 26,742 (1966)

MARTIN,B.T.
COOKE,B.A.
BLACK,W.P.
Evaluation of a rapid method for the measurement of plasma progesterone by competitive protein binding
J.Endocr. 46,369 (1970)

van der MOLEN,H.J.
AAKVAAG,A.
Progesterone
in: Hormones in blood
Academic Press, London 1967

van der MOLEN,H.J.
CORPÉCHOT,C.
Isolation and identification of progesterone from urine of nonpregnant women
J.clin.Endocr.28,1361 (1968)

van der MOLEN,H.J.
GROEN,D.
Determination of progesterone in human peripheral blood using gas-liquid chromatography with electron capture dedection
J.clin.Endocr. 25,1625 (1965)

MURPHY,B.E.P.
Application of the property of protein--binding to the assay of minute quantities of hormones and other substances
Nature 201,679 (1964)

MURPHY, B.E.P. — Some studies of the protein-binding of steroids and their application to the routine micro and ultramicro measurement of various steroids in body fluids by competitive protein-binding radioassay J.clin.Endocr. 27,973 (1967)

MURPHY, B.E.P.
ENGELBERG, W.
PATTEE, C.J. — Simple method for the ditermination of plasma corticoids J.clin.Endocr. 23,293 (1963)

MURPHY, B.E.P.
PATTEE, C.J. — Determination of plasma corticoids by competitive protein-binding analysis using gel filtration J.clin.Endocr. 24,919(1964)

NEILL, J.D.
JOHANSSON, E.D.B.
DATTA, J.K.
KNOBIL, E. — Relationship between the plasma level of LH and progesterone during the normal menstrual cycle J.clin.Endocr. 27,1167 (1967)

OBST, J.M.
SEAMARK, R.F. — Plasma progesterone concentrations during the reproductive cycle of ewes grazing yarloop clover J.Reprod.Fertil. 21,545 (1970)

ODELL, W.D.
SWERDLOFF, R.S. — Progestogen-induced luteinizing and follicle-stimulating homone surge in postmenopausal women: a simulatet ovulatory peak Proc.Nat.Acad.Sci.USA 61,529 (1968)

OERTEL, G.W.
WEISS, S.P.
EIK-NES, K.B. — Determination of progesterone in human blood plasma J.clin.Endocr. 19,213 (1959)

RAMAN, P.B.
AVRAMOR, R.
MACNIVEN, N.L.
DORFMAN, R.J. — A method for the determination of pregnanediol, pregnanetriol, and pregnanetriolone by gas chromatography Steroids 6,177 (1965)

RAO, C.V.
ETSREGREEN, V.L. — Competitive protein binding radioassay for progesterone J.Dairy Sci. 52.904 (1969)

REEVES, B.D.
DE SOUZA, M.L.A.
THOMPSON, I.E.
DICZFALUSY, E. — An improved method for the assay of progesterone by competitive protein binding Acta endocr. 63,225 (1970)

RIONDEL, A.
TAIT, J.F.
TAIT, S.A.S.
GUT, M.
LITTLE, B. — Estimation of progesterone in human peripheral blood using ^{35}S-thiosemicarbazide J.clin.Endocr. 25,229 (1965)

RUNNEBAUM,B. — Persönliche Mitteilung 1970

RUNNEBAUM,B.
van der MOLEN,H.
ZANDER,J. — Steroids in human peripheral blood of the menstrual cycle
Steroids, Suppl.2,189 (1965)

SCHUBERT,K.
FRANKENBERG,G.
WEHRBERGER,K.
ALBRECHT,R. — Zur Frage des Vorkommens von Progesteron im Harn
Naturwissenschaften 53,278 (1966)

SCHUBERT,K.
WEHRBERGER,K.
FRANKENBERG,G.
IGEL,H. — Progesteron und a,b-ungesättigte Steroidketone der C_{19}-Reihe im Harn bei Patientinnen mit Hirsutismus
Acta biol.med.germ. 18,551 (1967)

SCHUBERT,K.
WEHRBERGER,K.
WACHTEL,H. — Zum Nachweis von Progesteron im Normalharn
Mber.dtsch.Akad.Wiss.Berlin 9,49 (1967)

SCHUBERT,K.
WEHRBERGER,K.
WACHTEL,H.
SCHLEGEL,J. — Progesteron im Harn von Frauen und Männern
Endokrinologie 54,354 (1969)

SHORT,R.V. — Progesterone in blood
I.The chemical determination of progesterone in peripheral blood
J.Endocr. 16,415 (1958)

SHORT,R.V.
LEVETT,I. — The fluorimetric determination of progesterone in human plasma during pregnancy and the menstrual cycle
J.Endocr. 25,239 (1962)

SOMMERVILLE,I.F. — The quantitative determination of progesterone in human plasma
J.clin.Endocr. 17.317 (1957)

SOMMERVILLE,I.F.
DESHPANDE,G.N. — The quantitative determination of progesterone and pregnanediol in human plasma
J.clin.Endocr. 18,1223 (1958)

SOMMERVILLE,I.F.
PICKET,M.T.
COLLINS,W.P.
DENYER,D.C. — A modified method for the quantitative determination of progesterone in human plasma
Acta endocr. 43,101 (1963)

STAUB,M.C.
GAITAN,E.
DINGMAN,J.F. — A simple method for determination of urinary pregnanediol and pregnanetriol by glass fiber paper chromatography
J.clin.Endocr. 22,87 (1962)

STEMMLER,H.J. — Fibel der gynäkologischen Endokrinologie
Thieme Verlag, Stuttgart 1969

STROTT,C.A.
CARGILE,C.M.
ROSS,G.T.
LIPSETT,M.B.
The short luteal phase
J.clin.Endocr. 30,246 (1970)

STROTT,C.A.
LIPSETT,M.B.
Measurement of 17-hydroxyprogesterone in human plasma
J.clin.Endocr. 28,1426 (1968)

STROTT,C.A.
YOSHIMI,T.
ROSS,G.T.
LIPSETT,M.B.
Ovarian physiology: Relationship between plasma LH and steroidogenesis by follicle and corpus luteum; effect of HCG
J.clin.Endocr. 29,1157 (1969)

SURVE,A.H.
RANDEL,R.D.
ERB,R.E.
CALLAHAN,C.J.
Modified competetive proteinbinding method for the quantitation of blood plasma progesterone in cows
J.Anim.Sci. 27,1789 (1968)

SZEREDAY,Z.
SCHNEIDER,H.P.G.
Ein Beitrag zur Analyse von Pregnandiol
Klin.Wschr. 43,816 (1965)

TALBOT,N.B.
BERMAN,R.A.
MACLACHNAN,E.A.
WOLFE,J.K.
The colorimetric determination of neutral steroids (hormones) in 24-hour sample of human urine
J.clin.Endocr. 1,668 (1941)

THIYSSEN,J.H.H.
ZANDER,J.
Progesterone-4-^{14}C and its metabolites in the blood after introvenous injection into women
Acta endocr. 51,563 (1966)

TILLSON,S.A.
ERB,R.E.
NISWENDER,G.D.
Comparison of luteizing hormon and progesterone in blood metabolites of progesterone in urine of domestic sows during the estrous cycle and early pregnancy
J.Anim.Sci. 30,795 (1970)

TOUCHSTONE,J.C.
MURAVEC,T.
Enhancement of the fluorescence of progesterone (and other steroids) in sulfuric acid
Analyt.Chem. 32,822 (1960)

TROLLE,D.
Experimental and clinical investigations on the pregnanediol excretion in human urine
Acta endocr. 19,363 (1955)

VENNING,E.H.
Gravimetric method for the determination of sodium pregnandiol glucoronidate (an excretion product of progesterone)
J.biol.Chem. 119,473 (1937)

VENNNING,E.H.
BROWNE,J.S.L.
Studies on corpus luteum function. I. The urinary excretion of sodium pregnaediol glucuronidate in the human menstrual cycle
Endocrinology 21,711 (1937)

WALDI,D. Einfache quantitative Schnellbestimmung von Pregnandiol auf Dünnschichtplatten zum Frühschwangerschaftsnachweis und zur Überwachung des Cyclus bei der Frau
Klin.Wschr. 40,827 (1962)

WEISS,P.A.M. Einfache gaschromatographische Ruotine-bestimmung von Pregnandiol aus Schwangerenharn
Arch.Gynäk. 208,410 (1970)

WIEST,W.G. A double isotope derivative assay for progesterone and 20a-hydroxypregn-4-en-3-one
Steroids 10,257 (1967)

WIEST,W.G.
KENRENYI,T.
CSAPA,A. Aduoble isotope derivative dilution assay for progesterone in biological fluids and tissues
Excerpta med.Int.Congr.Series 111,114 (1966)

WOOLEVER,C.A. Daily plasma progesterone levels during menstrual cycle
Amer.Obstet.Gynec. 85,981 (1963)

WOOLEVER,C.A.
GOLDFIEN,A. A double isotope derivative dilution method for plasma progesterone assay
Int.J.appl.Radiat. 14,163 (1963)

WOTIZ,H.H. Studies in steriod metabolism XV.The rapid determination of urinary pregnanediol by gas chromatography
Biochim.biophys.Acta 69,415 (1963)

WYMAN,H.
SOMMERVILLE,I.F. The description and evaluation of a simple technique for the determination of plasma progesterone by thin-layer and gas-liquid chromatography
Steroids 12,63 (1968)

YANNONE,M.E.
MACCOMAS,D.B.
GOLDFIEN,A. The assay of plasma progesterone
J.Gaschromat. 2,30 (1964)

YOSHIMI,T.
LIPSETT,M.B. The measurement of plasma progesterone
Steroids 11,527 (1968)

YUSSMAN,M.A.
MELOIN,L.T.
MIYATA,J.
PHETEPLACE,C. Serum levels of follicle stimulating hormone, luteinizing hormone and plasma progestins correlated with human ovulation
Fertil.Steril. 21,119 (1970)

YUSSMAN,M.A.
TAYMOR,M.L. Serum levels of follicle stimulating hormoneand luteinizing hormone and plasma progesterone related to ovulation by corpus luteum biopsy
J.clin.Endocr. 30,396 (1970)

ZANDER,J. — Progesterone in human blood and tissues
Nature 174,406 (1954)

ZANDER,J.
FORTES,T.R.
von MÜNSTERMANN,A.M.
NEHER,R. — Δ^4-3-ketopregnene-20a-ol and Δ^4-3-ketopregnene-20ß-ol, two naturally metabolites of progesterone. Isolation, identification, biologic activity, and concentration in human tissues
J.clin.Endocr. 18,337 (1958)

ZANDER,J.
SIMMER,H. — Die chemische Bestimmung von Progesteron in organischen Substanzen
Klin.Wschr. 92,529 (1954)

L e b e n s l a u f

Geburt:	Am 5.7.1941 in Göttingen als erstes Kind des späteren praktischen Arztes Dr. Hans Dreykluft und seiner Ehefrau Anneliese, geb. Zieseniß.
Schule:	Volksschule in Göttingen und Berlin bis zur 7. Klasse humanistisches Gymnasium in Göttingen, danach naturwissenschaftliches Gymnasium in Göttingen, Uelzen, Hamburg-Harburg und Bremerhaven.
Abitur:	Im Frühjahr 1961 in Göttingen
Studium:	Vorklinischer Abschnitt in Göttingen und Berlin Physikum nach dem WS 63/64 in Göttingen. Klinischer Abschnitt in Köln und Berlin
Staatsexamen:	Am 27.3.68 mit Note "sehr gut" an der Freien Universität Berlin
Medizinalassistent:	9 Monate Innere Medizin, 4 Monate Chirurgie, 3 Monate Frauenheilkunde, 5 Monate gynäkologische Endokrinologie.
Approbation:	Am 1.1.70 in Berlin
Weitere Tätigkeiten:	Wissenschaftlicher Assistent an der Abt. für gynäkologische Endokrinologie der Frauenklinik im Klinikum Steglitz vom 2.1.70 bis 31.10.71, ab 1.11.71 bis auf weiteres Arzt im Organisations- und Planungsstab im Klinikum Steglitz

Herrn Professor Dr. J. Hammerstein danke ich für die Überlassung des Themas und die Unterstützung bei der Durchführung der Versuche und die kritische Diskussion von Ergebnissen.

Mein besonderer Dank gilt den medizinisch-technischen Assistentinnen im Hormonlabor der Abt. für gynäkologische Endokrinologie, insbesondere Frau I. Küspert für die Hilfe bei der Einarbeitung in methodisch-technische Fragen und bei der Durchführung des experimentellen Teils der Arbeit.

Herrn U. Trost danke ich für die intensive Beratung bei der Konzeption und Ausführung der Abbildungen.

Herrn Professor Dr. P. Koeppe gilt mein Dank für die Durchführung der statistischen Analyse der Standardkurven mit Hilfe der EDV.

B. Ladewig · Dissertationsdruck · 1 Berlin 12 · Pestalozzistraße 106
Tel.: 312 88 85 · 313 81 98